

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL BRAGA DE LIMA

**DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE LEVEDURAS VÍNICAS
PROVENIENTES DE COLOMBO, ESTADO DO PARANÁ**

**CURITIBA
2011**

DANIEL BRAGA DE LIMA

**DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE LEVEDURAS VÍNICAS
PROVENIENTES DE COLOMBO, ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim

Dr.^a Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth

**CURITIBA
2011**

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e aos seus professores pela realização deste trabalho.

Às professoras Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim e Dr.^a Cyntia Maria Teles Fadel-Picheth, pela orientação, confiança e oportunidade. Não saberia expressar tamanha gratidão pela forma como me receberam em seus laboratórios e pela grande contribuição em minhas formações pessoal e profissional.

Aos amigos e parceiros de trabalho dos laboratórios de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações, de Bacteriologia Clínica e Bioquímica Clínica pelo auxílio, amizade e incentivo.

À Ana Carolina e à minha família das quais nunca me faltou suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*Somos o que fazemos, mas somos, principalmente,
o que fazemos para mudar o que somos.*

Eduardo Galeano

RESUMO

O uso de leveduras selecionadas no processo de vinificação possui grande vantagem sobre a fermentação espontânea tradicional. Ademais, cepas de leveduras selecionadas produzem diferentes quantidades de metabólitos secundários que conferem características específicas aos vinhos, tornando a seleção de cepas autóctones, prática interessante. Entretanto, os processos de vinificação conduzidos em Colombo, estado do Paraná, ainda são caracterizados por pequenas propriedades, trabalho familiar e pelo processo de fermentação espontânea. O presente estudo propõe a diferenciação genotípica e fenotípica das cepas vínicas da região. Quatorze cepas de *Saccharomyces cerevisiae* previamente isoladas de seis cantinas rurais localizadas em Colombo foram analisadas por PCR-RFLP da região rDNA ITS e testadas para a detecção de atividade *killer* e produção de poligalacturonase e β -glucosidase. Os resultados indicaram que o PCR-RFLP com as enzimas *TaqI* e *Tru1I* se mostrou útil para a diferenciação genotípica, obtendo-se quatro e três padrões de restrição, respectivamente. A análise combinada dos perfis eletroforéticos resultou em um padrão adicional. A maioria das cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* apresentou o fenótipo *killer* (71,4%), o qual foi seguido pelos fenótipos neutro (21,4%) e sensível (7,1%). Uma vez que a expressão de enzimas tem papel importante para o aroma dos vinhos, foi interessante notar que 43% das cepas foram capazes de sintetizar poligalacturonase. Por outro lado, a atividade β -glucosidásica não foi detectada. Este estudo contribui para a seleção de cepas de autóctones de Colombo, com o objetivo de manter as características específicas dos vinhos da região.

Palavras-chave: leveduras vínicas autóctones. biodiversidade. caracterização enológica. *Vitis labrusca*.

ABSTRACT

The use of selected yeasts for winemaking has clear advantages over traditional spontaneous fermentation. Furthermore, selected yeast strains produce different amounts of secondary metabolites that impart specific characteristics to the wines, making interesting the selection of autochthon strains. However, the winemaking processes in Colombo, Parana State, are still characterized by small properties, family labor and spontaneous fermentation. This work proposes the genotypic and phenotypic differentiation of naturally occurring autochthon wine yeasts. Fourteen strains of *Saccharomyces cerevisiae* previously isolated from six rural wineries located in Colombo were analyzed by PCR-RFLP of rDNA ITS region and tested for the detection killer activity and production of polygalacturonase and β -glucosidase. The results showed that PCR-RFLP analyses with *TaqI* and *Tru1I* proved to be suitable for intraspecific differentiation, obtaining four and three restriction patterns, respectively. Combined analysis of both electrophoretic profiles generated an additional cluster of pattern. Most of the *Saccharomyces cerevisiae* wine strains presented killer phenotype (71,4%), followed by neutral (21,4%) and sensitive phenotypes (7,1%). Since enzymes play a very important role in wine aroma development, it was encouraging that 43% of the strains were able to synthesize polygalacturonase. On the contrary, β -glucosidase activity was not detected. This research contributes to the selection of autochthon yeast strains from Colombo, with the goal of maintaining the specific characteristics of their wine.

Keywords: autochthon wine yeasts. biodiversity. enological characterization. *Vitis labrusca*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DAS PRÁTICAS DE COLHEITA E ESMAGAMENTO DAS UVAS PARA A ELABORAÇÃO DO VINHO NO EGITO ANTIGO.....	12
FIGURA 2 - ISOTERMAS ANUAIS PROPÍCIAS À VITICULTURA	14
FIGURA 3 - MAPA POLÍTICO ESTADO DO PARANÁ, COM DESTAQUE PARA O MUNICÍPIO DE COLOMBO.	14
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ADAPTAÇÃO GENÔMICA DE CEPAS VÍNICAS À DIFERENTES LOCALIDADES	23
FIGURA 5 - PROPOSTA DO MODO DE AÇÃO DA TOXINA <i>KILLER K1</i>	27
FIGURA 6 - ETAPAS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TERPENOS	32
FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ENZIMÁTICA DA ATUAÇÃO DE PECTINASES NA CLARIFICAÇÃO DE VINHOS	35
FIGURA 8 - ESTRUTURA DO DNA RIBOSSOMAL DE FUNGOS	40
FIGURA 9 - MAPA DO MUNICÍPIO DE COLOMBO COM A LOCALIZAÇÃO DAS CANTINAS RURAIS DE ONDE FORAM ISOLADAS AS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZADAS NESTE ESTUDO	42
FIGURA 10 – PRODUTOS DE PCR DA REGIÃO rDNA ITS COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ITS1 E NL2	53

FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO (MONTAGEM DE DOIS GÉIS) DA REGIÃO rDNA ITS CLIVADA PELA ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO <i>TaqI</i>	55
FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO (MONTAGEM DE DOIS GÉIS) DA REGIÃO rDNA ITS CLIVADA PELA ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO <i>Tru1I</i>	58
FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS PARA VERIFICAÇÃO DE PRODUÇÃO E RESISTÊNCIA À TOXINA <i>KILLER</i>	63
FIGURA 14 - <i>SCREENING</i> PARA A EXPRESSÃO DA ENZIMA β -GLUCOSIDASE EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO ARBUTIN E ÍONS FERRO	69
FIGURA 15 - <i>SCREENING</i> PARA A EXPRESSÃO DE POLIGALACTURONASE EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO	72

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE UVAS NO BRASIL, EM TONELADAS	15
TABELA 2 - ÁREA PLANTADA DE VIDEIRAS NO BRASIL, EM HECTARES	15
TABELA 3 - CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZADAS NESTE TRABALHO	41
TABELA 4 – CONDIÇÃO PARA A REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA DAS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	45
TABELA 5 - CONDIÇÃO PARA A REAÇÃO DE PCR-RFLP PARA A OBTENÇÃO DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA DAS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
TABELA 6 - CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA NA DETERMINAÇÃO DA CARACTERÍSTICA <i>KILLER</i>	47
TABELA 7 - INTENSIDADE DAS BANDAS DOS FRAGMENTOS CONSIDERADOS PARA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA APÓS PCR-RFLP COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>TaqI</i>	55
TABELA 8 - INTENSIDADE DAS BANDAS DOS FRAGMENTOS CONSIDERADOS PARA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA APÓS PCR-RFLP COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Tru1I</i>	58
TABELA 9 - PADRÕES DE RESTRIÇÃO OBTIDOS COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO <i>TaqI</i> E <i>Tru1I</i>	60

TABELA 10 – VERIFICAÇÃO DA CARACTERÍSTICA <i>KILLER</i> EM CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
TABELA 11 – RESULTADOS DO <i>SCREENING</i> PARA A EXPRESSÃO DE POLIGALACTURONASE	73
TABELA 12 - COMPILAÇÃO DE PROPRIEDADES ENOLÓGICAS TESTADAS NAS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISOLADAS DE COLOMBO, ESTADO DO PARANÁ	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- °Bx: grau Brix (porcentual em massa de sólidos solúveis em solução)
- °GL: grau Gay-Lussac (porcentual volumétrico de etanol em solução)
- A₆₅₀: absorbância com leitura em comprimento de onda 650 nm;
- BSA: albumina do soro bovino
- dsRNA: ácido ribonucleico de dupla fita
- EC: classificação numérica de enzimas (do inglês, *Enzyme Commission number*)
- EDTA: ácido etilenodiamino-tetra-acético
- IG: indicação geográfica
- ITS: espaçador interno transcrito
- PCR: reação em cadeia da polimerase
- pSNP - polimorfismo parcial de único nucleotídeo (do inglês, *partial single nucleotide polymorphism*)
- RAPD: análise de polimorfismo de DNA genômico ao acaso
- RFLP: polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
- rRNA: RNA ribossomal
- rDNA: DNA ribossomal
- RNase A: ribonuclease A
- SDS: dodecil sulfato de sódio
- Tris: tris (hidroximetil)-aminometano
- TBE: solução tamponante Tris-Borato-EDTA
- TE: solução tamponante Tris-EDTA
- YEPD: meio de cultivo para leveduras (do inglês, *yeast extract, peptone, dextrose*)
- YNB: base nitrogenada para leveduras (do inglês, *yeast nitrogen base*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
3.1 UVAS: COMPOSIÇÃO, VARIEDADES E GEOGRAFIA	11
3.2 INDICAÇÃO GEOGRÁFICA.....	17
3.3 ECOLOGIA DO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO	19
3.3.1 Utilização de cepas selecionadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.4 CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS	25
3.4.1 Característica <i>killer</i>	25
3.4.2 Síntese de hidrolases	29
3.4.2.1 Expressão da enzima β -glucosidase.....	30
3.4.2.2 Expressão de enzimas pectinolíticas.....	33
3.5 IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	36
3.5.1 DNA ribossomal	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
4.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	43
4.3 DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.3.1 Extração de material genômico	43
4.3.2 Amplificação da região rDNA ITS.....	44
4.3.3 PCR-RFLP	46
4.4 DIFERENCIAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47

4.4.1 Determinação da característica <i>killer</i>	47
4.4.2 Determinação da capacidade de produção de etanol	48
4.4.3 <i>Screening</i> para expressão da enzima β -glucosidase	49
4.4.4 <i>Screening</i> para expressão de enzimas pectinolíticas	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS VÍNICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
5.2 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES ENOLÓGICAS	61
5.2.1 Verificação da característica <i>killer</i>	61
5.2.2 Expressão da enzima β -glucosidase	67
5.2.3 Expressão de poligalacturonase	70
5.3 SELEÇÃO DE CEPAS VÍNICAS	74
6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

O conceito do vinho como um produto natural e completo é o cerne de todo o seu *marketing*. Estabelecer sua identidade é de grande importância, uma vez que a reputação desenvolvida pelos produtores de uma região é tida, frequentemente, como sinônimo da qualidade da bebida (ADDOR; THUMM; GRAZIOLI, 2003; OVERTON, 2010).

O aspecto e as características organolépticas são fatores que, em um primeiro momento, são responsáveis por sua aceitação pelo consumidor. Do ponto de vista tecnológico, são reflexo da composição química do vinho resultante da interação entre uva, tecnologia e micro-organismos (FLEET, 2003; NIKOLAOU *et al.*, 2007; RODRÍGUEZ *et al.*, 2010). Ao conjunto de propriedades que cada levedura possui de influenciar esta composição química e a eficiência do processo de vinificação, dá-se o nome de propriedades enológicas, e seu estudo pode ser considerado a primeira etapa no processo de elaboração do vinho.

Diferentemente de algumas décadas atrás, à levedura *Saccharomyces cerevisiae* é atribuída a produção de diversos metabólitos que influenciam no aroma e no sabor do vinho. Com isso, tornou-se comum o isolamento e manutenção de cepas desta levedura para a utilização na vinificação na busca de maior controle do processo (FLEET, 2008). A identificação de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* conforme variavam as localidades dos vinhedos começou a ser relacionada à capacidade de adaptação a regiões específicas e à produção de vinhos com características únicas, típicas de cada região (ROMANO *et al.*, 2008; ORLIĆ *et al.*, 2010; PATHANIA *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; SALINAS *et al.*, 2010).

O Brasil, apesar de não ser visto como um país produtor de vinho, no ano de 2009 produziu cerca de 245 milhões de litros da bebida (UVIBRA, 2010). No país, são cultivadas uvas da espécie *Vitis labrusca*, dada sua longevidade e maior adaptação às condições climáticas. No estado do Paraná, particularmente no município de Colombo há a produção de cerca de 1500 toneladas de uvas comuns

pertencentes à espécie *V. labrusca*, que originam cerca de 800.000 litros de vinho artesanal anualmente. No município, o Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, por meio do Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, mantém um programa de extensão (PROEC 90/09), que visa a apresentação de alternativas para o melhoramento da tecnologia de produção do vinho (DORNELES, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2006).

No contexto do que foi apresentado, o trabalho justifica-se pela necessidade da diferenciação das cepas de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* isoladas do município de Colombo, PR, bem como determinação de suas características enológicas para o auxílio à definição das peculiaridades do vinho elaborado. A associação da qualidade do vinho produzido à região agregaria valor e reputação ao produto, com a perspectiva do aumento de sua penetração no mercado e contribuição para o desenvolvimento socioeconômico do município.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Diferenciar genotípica e fenotipicamente as cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* provenientes de uvas da espécie *Vitis labrusca* de seis cantinas rurais localizadas no município de Colombo, estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar o padrão de restrição (PCR-RFLP) da região rDNA ITS de cada cepa vínica isolada;
- b) Classificar o fenótipo das cepas vínicas em relação à capacidade de produção e resistência a toxina *killer* K2;
- c) Verificar a capacidade de cada cepa vínica em demonstrar atividades β -glucosidásica e poligalacturonásica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 UVAS: COMPOSIÇÃO, VARIEDADES E GEOGRAFIA

Desde que se começou a registrar a história, há relatos da produção de pão e bebidas por meio de processos fermentativos. Dados arqueológicos indicam que a produção e o consumo do vinho datam de 7500 anos atrás, idade estimada do que se suspeitam ser resíduos de vinho encontrados no norte do Irã. No entanto, a primeira evidência que comprova, de fato, a fabricação e o consumo do vinho são representações de seu processo de fabricação (Figura 1) de mais de 5000 anos, encontradas no Egito (WIEL; GOLDE; HART, 2001; JACKSON, 2008). Uma hipótese bem aceita é que frutas e seus produtos de fermentação foram utilizados para o tratamento de doenças em um período que se estende, principalmente, desde a Era Paleolítica até o surgimento da medicina moderna (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997; MCGOVERN; MIRZOIAN; HALL, 2009).

Por influência dos romanos, o consumo de uvas da espécie *Vitis vinifera* foi difundido pelo continente europeu, principalmente pela existência de feiras e rotas comerciais. Já nesta época era feita a diferenciação entre uvas finas e uvas de mesa. Na idade média, a religião teve papel importante na disseminação do cultivo da uva, muito devido à expansão do cristianismo e do islamismo. Posteriormente, com o descobrimento do continente americano, houve a introdução da uva pelos missionários, que traziam sementes da França, Alemanha, Espanha e Itália (THIS; LACOMBE; THOMAS, 2006).

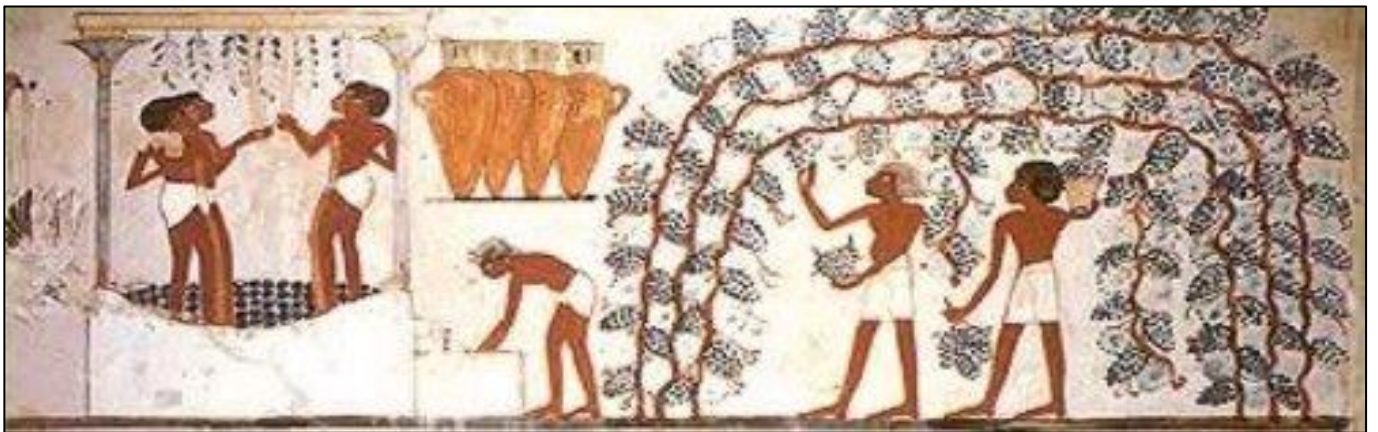


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DAS PRÁTICAS DE COLHEITA E ESMAGAMENTO DAS UVAS PARA A ELABORAÇÃO DO VINHO NO EGITO ANTIGO

FONTE: <http://www.vinaspora.com>

A uva é a matéria-prima para a produção de vinhos, sendo seu grau de maturação e, por consequência, sua composição química, fundamentais na determinação da qualidade do vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Tal composição sofre influência não só do teor de carboidratos fornecido para a fermentação, mas também dos teores de nitrogênio e potássio, da acidez, além de seus aromas vegetativos e seu estado sanitário (DORNELES, 2003).

O grão de uva é formado por película ou casca, sementes e polpa. A depender da variedade da uva, a massa de sua casca pode corresponder entre 8 e 20% do grão. Na polpa, é notável o acúmulo de uma ampla variedade de álcoois, aldeídos e ésteres, sendo considerada juntamente com a casca, a principal provedora de substâncias aromáticas. Já as sementes representam cerca de 0 a 6% da massa do grão, contribuindo com parte da concentração dos carboidratos e pequenas porções de compostos nitrogenados e minerais. São fontes de compostos fenólicos, contendo entre 20 e 55% da quantidade total presente na fruta (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

O cultivo desta fruta é altamente dependente das condições climáticas, onde regiões próximas a isotermas anuais entre 10 e 20 °C (Figura 2), clima semelhante ao clima mediterrâneo, apresentam o melhor perfil (JACKSON, 2008; ORDUÑA, 2010). No Brasil, a produção concentra-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste e aparece em menor proporção na região Nordeste (DORNELES, 2003). Como maiores produtores, podem ser citados os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Pernambuco e Paraná (MELLO, 2010).

Dados da unidade Uva e Vinho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) mostram que a produção de uvas no Brasil em 2009 foi de 1.345.719 toneladas, interrompendo a crescente tendência dos últimos anos, com ligeira queda em relação ao ano de 2008 (Tabela 1) (MELLO, 2010). Os estados de Minas Gerais, São Paulo e Bahia foram onde mais se observou a queda da produção, acompanhadas pela diminuição da área plantada de videiras. Em contrapartida, o estado do Paraná (Figura 3) manteve os resultados do ano de 2008, com discreto aumento de 0,57% no cultivo da fruta, ao mesmo tempo em que teve constante a área de 5.800 ha de videiras plantadas (Tabela 2) (MELLO, 2010).

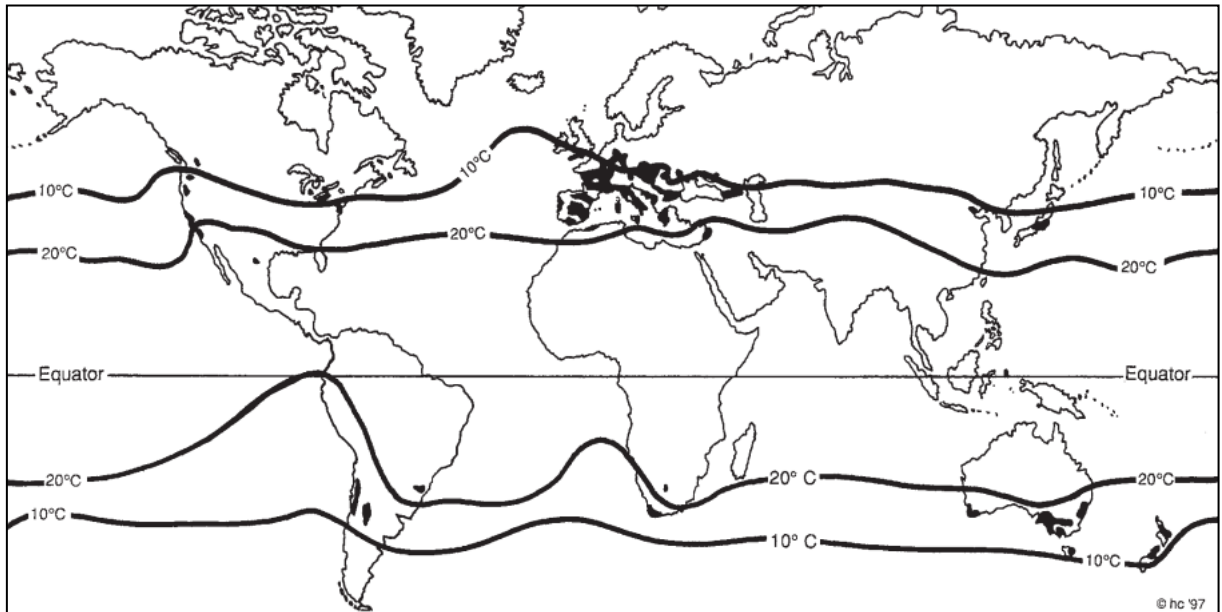


FIGURA 2 - ISOTERMAS ANUAIS PROPÍCIAS À VITICULTURA
FONTE: Jackson (2008)



FIGURA 3 - MAPA POLÍTICO ESTADO DO PARANÁ, COM DESTAQUE PARA O MUNICÍPIO DE COLOMBO.

FONTE: <http://pt.wikipedia.org>

NOTA: No mapa maior, colorido de vermelho encontra-se o município de Colombo. No canto direito superior, mapa menor, a mesma cor indica o estado do Paraná.

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE UVAS NO BRASIL, EM TONELADAS

Estado/Ano	2007	2008	2009
Pernambuco	170.326	162.977	158.515
Bahia	120.654	101.787	90.508
Minas Gerais	11.995	13.711	11.773
São Paulo	193.023	184.930	177.934
Paraná	99.180	101.500	102.080
Santa Catarina	54.554	58.330	67.546
Rio Grande do Sul	705.228	776.027	737.363
Brasil	1.354.960	1.399.262	1.345.719

FONTE: Mello (2010)

TABELA 2 - ÁREA PLANTADA DE VIDEIRAS NO BRASIL, EM HECTARES

Estado/Ano	2007	2008	2009
Pernambuco	7.137	7.083	7.104
Bahia	4.096	4.405	3.724
Minas Gerais	878	906	854
São Paulo	11.039	9.750	9.750
Paraná	5.700	5.800	5.800
Santa Catarina	4.915	4.836	4.937
Rio Grande do Sul	48.428	49.819	50.415
Brasil	82.193	82.599	82.584

FONTE: Mello (2010)

Em contraste ao cultivo quase que exclusivo de uvas da espécie *Vitis vinifera* por países com tradição na produção de vinho, uvas americanas da espécie *Vitis labrusca* compõem mais de 80% das quase 1,4 milhões de toneladas colhidas no Brasil (BARNABÉ; FILHO; BOLINI, 2007; YANG; MARTINSON; LIU, 2009; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIERREZ, 2010). De maneira geral, as uvas desta espécie caracterizam-se por apresentar longevidade, elevada produtividade e alta resistência às doenças que acometem as cultivares de *V. vinifera*, como o míldio e o oídio (EMBRAPA, 2005).

Em relação à produção de vinhos comuns ou vinhos de mesa elaborados a partir de uvas da espécie *V. labrusca*, prepondera o uso de uvas das variedades Isabel (BORDIGNON-LUIZ *et al.*, 2007; TECCHIO; MIELE; RIZZON, 2007; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIERREZ, 2010), Niágara Branca e Bordô, (BARNABÉ; FILHO; BOLINI, 2007), esta última, no Paraná, também conhecida como Terci.

Em algumas variedades de *V. labrusca* a glucose e frutose encontram-se aproximadamente na mesma concentração, em torno de 10 g/100 g de suco, enquanto que a sacarose pode aparecer em concentração igual a 0,2 a 1 g/100 g de suco (ZOECKLEIN *et al.*, 2001). O vinho produzido a partir da variedade Bordô tem aroma frutado intenso e é bastante consumido no país, com grande potencial de expansão. Este potencial também se aplica aos outros produtos derivados dessa cultivar, como vinagre, suco, geleia e a própria uva para consumo direto (CHOCIAL *et al.*, 2000; ROMBALDI *et al.*, 2004).

No país, a vinicultura tem caráter familiar e é predominantemente realizada em pequenas propriedades. Ainda assim, publicações sobre o assunto são escassas se comparadas à literatura referente aos vinhos finos, *i.e.*, produzidos a partir de uvas da espécie *Vitis vinifera* (BARNABÉ; FILHO; BOLINI, 2007). No entanto, o crescente interesse em se estabelecer uma relação entre o perfil químico dos vinhos brasileiros e aspectos da saúde humana tendem a alterar este panorama (ABE *et al.*, 2007; DANI *et al.*, 2010; NIXDORF; HERMOSÍN-GUTIERREZ, 2010).

3.2 INDICAÇÃO GEOGRÁFICA

Entende-se por Indicação Geográfica (IG) a identificação de um produto ou serviço originário de um local, região ou país, quando determinada reputação, característica ou qualidade possa ser vinculada essencialmente a esta sua origem particular (BRASIL, 1996). Este é um conceito que se desenvolveu lentamente, quando produtores, comerciantes e consumidores comprovaram que alguns produtos de determinadas localidades apresentavam qualidades particulares, servindo como ferramenta de desenvolvimento e promoção regional (KAKUTA *et al.*, 2006; PARR *et al.*, 2007; COZZOLINO *et al.*, 2011).

Em 1905, a França foi pioneira ao estabelecer uma lei sobre fraudes e falsificações em matérias de produtos e serviços, determinando as bases para a proteção da origem e qualidade de vinhos (KAKUTA *et al.*, 2006). Posteriormente, os países em desenvolvimento começaram a notar as vantagens das IG em relação ao desenvolvimento rural e proteção comercial não só de produtos, mas também de tradições. O México foi o primeiro, em 1974, possuindo hoje os famosos café e tequila Vera Cruz. Em 1996, Brasil e Peru tiveram legislações regulamentando o assunto, seguidos pela Coreia do Sul e Índia, em 1999, Colômbia, em 2000, e Chile, em 2005 (BRASIL, 1996; KAKUTA *et al.*, 2006; BOWEN; ZAPATA, 2009).

A Europa tem grande importância e participação no ramo das IG, sendo estas o cerne de sua política agrícola (PARR *et al.*, 2007). Logo, o continente apresenta IG bastante conhecidas, como vinhos das regiões de *Bordeaux* e *Champagne* e os queijos *Roquefort* e *Comté* (França), o vinho do Porto e o queijo da Serra da Estrela (Portugal), o presunto de Parma e o queijo Parmesão (Itália), entre outros. No Brasil, alguns exemplos são os vinhos do Vale dos Vinhedos (RS), o café do Cerrado Mineiro (MG), E aguardentes do tipo cachaça de Paraty (RJ), entre outras (KAKUTA *et al.*, 2006; INPI, 2011).

Cientistas sociais identificaram uma série de benefícios fortemente atrelados à IG. Dentre eles, a proteção de produtores e consumidores, a preservação das particularidades e personalidade dos artigos (patrimônios de cada região), o estímulo a investimentos e a geração de novos empregos (ADDOR; THUMM; GRAZIOLI, 2003; BOWEN; ZAPATA, 2009). Exemplificando o desenvolvimento

econômico de uma região, podem ser citadas as Rotas do Vinho, áreas normalmente reconhecidas pela produção da bebida e pela identidade que possuem com este produto, como é o caso das regiões de *Champagne*, na França, e *Stellenbosch*, na África do Sul (BRUWER, 2003). No Brasil, ganha destaque o enoturismo praticado na região do Vale dos Vinhedos, Rio Grande do Sul. Similarmente, e guardadas as proporções, a região de Colombo, Paraná, aparece com o Circuito Italiano, que conta com visitas a vinícolas, restaurantes, museus, igrejas e parques. Mais recentemente, conta também com a Escola da Uva e do Vinho que funciona como centro de treinamento e capacitação de técnicos e agricultores familiares para a difusão de novas tecnologias.

Tratando-se da indústria vinicultora, ao local de fabricação do vinho é dispensada atenção especial dada influência que tem sobre as características da bebida. Utiliza-se o termo francês *terroir* para se englobar não somente as características físicas de uma região (como o solo, o clima e a topografia), mas também para atrelar a isso o aspecto humano, envolvendo suas cultura, história e tecnologia. Neste contexto, e de maneira geral, o investimento de capital é atraído pela especulação de que em determinada localidade há potencial para o desenvolvimento de uma marca. A interpretação conjunta destes conceitos sugere que a essência de uma localidade pode ser captada em uma taça de vinho (LOUREIRO, 2003; OVERTON, 2010).

O desenvolvimento de metodologias laboratoriais para a classificação de vinhos de acordo com a origem geográfica tem se mostrado um fator importante na busca pela proteção comercial conferida por uma IG (EGLI *et al.*, 1998; BRESCIA *et al.*, 2002; GAMBELLI; SANTARONI, 2004; LUYKX; RUTH, 2008; COZZOLINO *et al.*, 2011). Ademais, a relação entre a diversidade de micro-organismos de determinadas regiões e o estabelecimento de características únicas que conferem ao vinho tem sido evidenciada por programas de seleção de leveduras vínicas (ROMANO *et al.*, 2003; FLEET, 2008; ROMANO *et al.*, 2008; PÉREZ, G. *et al.*, 2010; SALINAS *et al.*, 2010).

3.3 ECOLOGIA DO PROCESSO DE VINIFICAÇÃO

A camada externa do grão de uva é coberta por uma cutícula cerosa, a pruína, que contribui para a aderência de uma série de micro-organismos à fruta (COMBINA *et al.*, 2005). Esta presença é determinada por fatores como precipitação, grau de maturação da uva, intensidade de ataques de outros seres vivos e aplicação de fungicidas e inseticidas. Logo, fica evidente que cada região possui uma população singular de micro-organismos, de acordo com seu *terroir* (COMBINA *et al.*, 2005; RASPOR *et al.*, 2006).

A produção do vinho tem início com a colheita e o esmagamento das uvas. O suco resultante do esmagamento das uvas é adicionado de solução de metabissulfito de potássio para que sejam inibidos o desenvolvimento de bactérias indesejadas e o processo de oxidação do mosto. Posteriormente, o suco é transferido às dornas de fermentação para o início da fermentação alcoólica (CHOCIAI *et al.*, 2000; GRAINGER; TATTERSALL, 2005; MILLS *et al.*, 2008).

O papel das leveduras na fermentação alcoólica, particularmente na transformação do suco de uva em vinho, foi estabelecido apenas no decorrer do século XIX, com os trabalhos de Pasteur, mesmo tendo Antonie van Leeuwenhoek já observado tais micro-organismos no mosto de cerveja (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Atualmente, sabe-se que este é um processo microbiológico complexo que envolve diferentes espécies de leveduras e bactérias (FERNÁNDEZ; UBEDA; BRIONES, 1999; TORIJA *et al.*, 2001; SALINAS *et al.*, 2009). A fermentação é denominada espontânea se não houver qualquer tipo de inoculação de micro-organismos no mosto, sendo, então, iniciada e conduzida exclusivamente pela microbiota naturalmente presente na pruína das uvas, formada em grande parte por leveduras dos gêneros *Kloeckera*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Torulaspora* (FLEET, 2008).

O fato das leveduras pertencentes a estes gêneros produzirem pouco etanol, fez com que se acreditasse que o rápido incremento na concentração de etanol nos segundo e terceiro dias de processo fosse a única causa para que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* dominasse o processo deste período em diante (RAINIERI; PRETORIUS, 2000; ROMANO *et al.*, 2003).

Goddard (2008), no entanto, obteve resultados que sugerem que a alta concentração de etanol é apenas um dos fatores. Outro fator de importância no domínio do processo e que atua em sinergismo com o primeiro, é o efeito *Crabtree*, i.e., a possibilidade de haver fermentação em aerobiose quando as concentrações de açúcar são maiores do que 9 g.l^{-1} . A fermentação, uma reação exergônica, resulta no aumento da temperatura do mosto. Este aumento na temperatura resulta em maior toxicidade do etanol às leveduras não-*Saccharomyces* e possibilita, então, o desenvolvimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e eliminação dos micro-organismos dos outros gêneros.

São, justamente, estas composição e dinâmica de micro-organismos as responsáveis pelas características do vinho produzido (FALQUÉ; FERNÁNDEZ; DUBOURDIEU, 2001; FLEET, 2003, 2007; NIKOLAOU *et al.*, 2007; PARR *et al.*, 2007; CHAVAN *et al.*, 2009).

No decorrer da fermentação alcoólica, o gás carbônico liberado faz com que os sólidos da uva migrem para a superfície das dornas, provocando a formação de uma camada isolante (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Isto torna necessário o procedimento da remontagem, no qual o mosto da parte inferior é bombeado para a parte superior. Com a diminuição da liberação de gás carbônico, o bagaço do suco parcialmente fermentado é separado (descuba) e os açúcares que ainda não foram fermentados são lentamente convertidos a etanol (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004; GRAINGER; TATTERSALL, 2005).

Além da fermentação alcoólica, uma segunda fermentação é recorrente na produção de vinhos, a fermentação malolática. Esta fermentação é conduzida por algumas bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pedicoccus* que sejam resistentes ao baixo pH e às altas concentrações de dióxido de enxofre e etanol. A fermentação malolática tem a principal função de fermentar açúcares remanescentes desenvolvendo, assim, novos compostos aromáticos (BAUER; DICKS, 2004). O processo é, então, seguido pelas etapas de trasfegas, maturação, filtração e envase (PRETORIUS; HØJ, 2005).

Se, por um lado, a dinâmica populacional da fermentação espontânea confere aos vinhos perfis químico e sensorial únicos (FLEET, 2003), por outro, é imprevisível e inconstante e pode representar perda da uniformidade e, por vezes, inviabilizar o produto (MALHERBE; BAUER; TOIT, 2007; CAPECE *et al.*, 2010;

RODRÍGUEZ *et al.*, 2010). Diante da situação, o uso de culturas puras de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que desenvolveram especializações propícias à fermentação vínica é uma estratégia bastante utilizada (XUFRE *et al.*, 2000; SCHULLER *et al.*, 2004; RASPOR; ZUPAN; ČADEŽ, 2007), mesmo que isso possa representar risco da perda de complexidade do produto (CLEMENTE-JIMENEZ *et al.*, 2004; BARRAJÓN *et al.*, 2009).

3.3.1 Utilização de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*

Até meados da década de 1980 a contribuição das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* à vinificação era considerada simplória onde, essencialmente, consistia do metabolismo glicolítico dos açúcares do mosto. O maior entendimento do processo atrelou à levedura outras funções, como a ativação de compostos aromáticos (VARELA *et al.*, 2009), tornando práticas comuns seu isolamento e sua manutenção para que sejam utilizadas culturas puras destes micro-organismos para iniciar e conduzir a vinificação (PRETORIUS; HØJ, 2005; FLEET, 2008). Por este motivo, são referidos na literatura como culturas puras *starter* ou iniciadoras.

O uso de culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae* é bastante difundido, dada clara vantagem que a prática tem sobre o processo tradicional, pois torna a fermentação reprodutível, reduz o risco de contaminação e permite maior controle sobre as características da bebida (ORLIĆ *et al.*, 2010). No entanto, a principal crítica que ainda recebe é em relação às propriedades, por vezes ordinárias, de culturas puras comerciais, que resulta em vinhos de qualidade e complexidade medianas (RAINIERI; PRETORIUS, 2000).

De maneira geral, cepas isoladas do ambiente, também chamadas de selvagens, apresentam polimorfismo genético por meio da recombinação de retrotransposons *Ty* e aneuploidia (AA *et al.*, 2006; SIPICZKI, 2010). Apesar de se considerar que muitas das alterações genéticas são neutras ou danosas, acredita-se que outras confirmam vantagens seletivas à cepa principalmente pelo aumento do número de cópias de genes que lhe representam benefício (HAUSER *et al.*, 2001;

INFANTE *et al.*, 2003; SALINAS *et al.*, 2010), diversificando e especializando-as (HERAS-VAZQUEZ *et al.*, 2003; MORRISEY *et al.*, 2004; BORNEMAN *et al.*, 2008; LITI *et al.*, 2009). A translocação do gene *SSU1* que confere resistência ao sulfito e o aumento do número de cópias dos genes que codificam a enzima álcool desidrogenase, e, portanto diminuem os níveis de acetaldeído no vinho, são exemplos de alterações genéticas que se fixaram em algumas populações de *Saccharomyces cerevisiae* (SIPICZKI, 2010). Um modelo para a adaptação do genoma de cepas vínicas a um determinado local e/ou tecnologia de vinificação pode ser ilustrado pela Figura 4.

Salinas *et al.* (2010) compararam genotípica e fenotipicamente a cepa comercial EC1118 (Lalvin) às cepas selvagens LV CB e L-957, isoladas de regiões vinícolas Casablanca (Chile) e Mendoza (Argentina). Os autores observaram similaridade genotípica entre cepas selvagens e a cepa comercial e tal qual Carreto *et al.* (2008), puderam detectar amplificações e deleções no genoma das cepas e relacionar estas alterações a diferenças fenotípicas, e.g, adaptações à fermentação alcoólica.

Atualmente há grande interesse na utilização de cepas selecionadas para a condução da vinificação, no entanto, com o diferencial de que sejam associadas a uma cultivar ou região particular com a premissa de que confirmem vantagens tecnológicas e, com maior apelo, um caráter regional, tipicidade ao vinho (LOPES *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2007; SANGORRÍN *et al.*, 2007; FLEET, 2008; VARELA *et al.*, 2009; CALLEJON *et al.*, 2010; ORLIĆ *et al.*, 2010; SALINAS *et al.*, 2010). A variação na presença de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em função de microáreas já foi reportada em algumas oportunidades, como Naumova *et al.* (2003) e Badotti *et al.* (2009), quando do estudo de leveduras para a produção de cerveja de sorgo e cachaça, respectivamente.

Publicações semelhantes foram realizadas com leveduras de interesse enológico por González, Barrio e Querol (2006), Agnolucci *et al.* (2007), Chavan *et al.* (2009) e Clavijo *et al.* (2010). Todas observaram diferenças na estrutura populacional de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* conforme variaram as vinícolas ou regiões dentro de uma única vinícola.

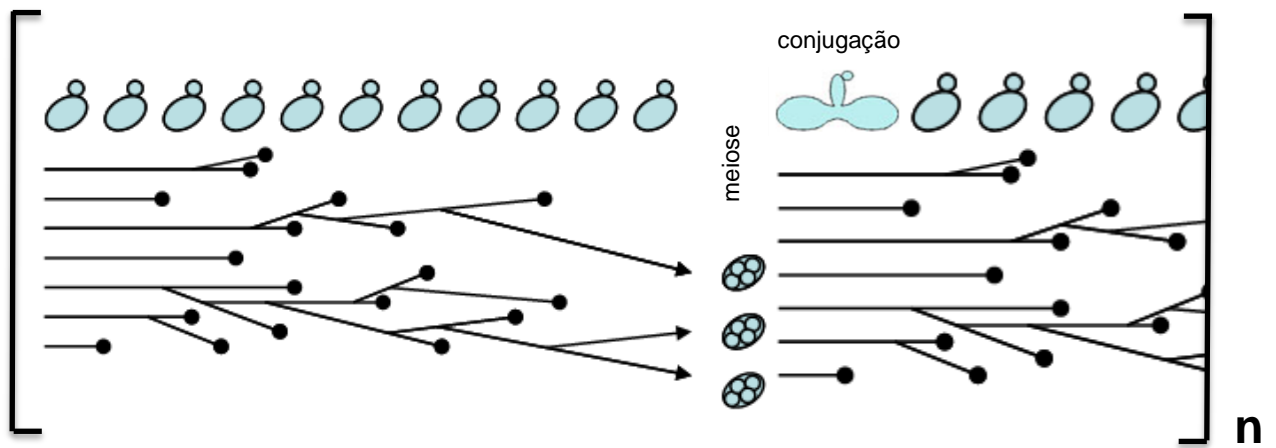


FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ADAPTAÇÃO GENÔMICA DE CEPAS VÍNICAS À DIFERENTES LOCALIDADES

FONTE: Adaptado de Sipiczki (2010)

NOTA: Cada linha representa uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Cepas menos competitivas são, gradualmente, eliminadas (círculo fechado ao final da linha). Cepas que não são eliminadas (setas ao final de cada linha) esporulam. Estes podem conjugar e começar um novo ciclo.

Esteve-Zarzoso *et al.* (2000) conduziram vinificações utilizando cepas comerciais e autóctones de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas da região de El Penedès, Espanha. Parâmetros físico-químicos do vinho, bem como a capacidade das leveduras se desenvolverem no mosto foram comparados. De maneira geral, os parâmetros físico-químicos foram semelhantes entre as cepas comerciais e autóctones, embora diferenças nos resultados de acidez volátil e capacidades de produção de ésteres de baixo peso molecular e ácidos graxos tenham sido notadas. Ainda assim, a avaliação sensorial mostrou-se semelhante entre os vinhos produzidos. Outro ponto ressaltado pelos autores foi a maior capacidade de cepas autóctones se desenvolverem no mosto. Após 48 h do início da vinificação 95% dos micro-organismos no mosto correspondiam às cepas autóctones. Em contrapartida, quando o inóculo foi realizado com cepas comerciais, no mesmo tempo de processo, estas correspondiam a apenas 50% dos micro-organismos.

Lopes *et al.* (2007), reportaram análises na busca da implantação da cepa selvagem MMf9 na elaboração de vinhos na região da Patagônia, Argentina. Como controle, um processo de vinificação foi conduzido com a cepa comercial BC (Danstar Ferment). Tal qual observado por Esteve-Zarzoso *et al.* (2000), a cepa autóctone representou a maior parte dos micro-organismos presentes no mosto (80%) quando comparada à cepa BC (30%). Por outro lado, ainda em comparação ao estudo citado, a análise sensorial atribuiu maior complexidade aos vinhos resultantes da inoculação da levedura autóctone.

Callejon *et al.* (2010), seguiram a mesma linha destas pesquisas e compararam o perfil metabólico de vinhos Merlot obtidos utilizando-se cepa comercial Excellence XR ou uma das quatro cepas isoladas do mesmo local de colheita das uvas. Diferentemente dos trabalhos citados, não houve diferença entre a capacidade de desenvolvimento das leveduras no mosto; após 24 horas do início do processo foi observado completo domínio das cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de o consumo de açúcar ter sido mais lento pela cepa comercial. Os autores também constataram não haver diferenças quanto aos parâmetros físico-químicos analisados, como concentrações de etanol e ácido málico, acidez volátil e pH. Entretanto, o perfil metabólico de compostos voláteis como terpenos, álcoois e ésteres mostrou-se significativamente diferente a depender da cepa utilizada. Este

resultado foi refletido pela análise sensorial dos vinhos, onde aqueles obtidos pela utilização das leveduras autóctones foram considerados de melhor qualidade.

Capece *et al.* (2010), conduziram um processo de elaboração de vinhos a partir de uvas colhidas na região siciliana de Nero d'Avola e utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de diferentes áreas desta mesma região como micro-organismos iniciadores. Os autores citam a capacidade fermentativa como o único parâmetro comum às cepas. Já os metabólitos relacionados ao perfil sensorial do vinho, principalmente acetaldeído, álcoois amílicos e ácido acético, diferiram entre os vinhos produzidos. Essa diferença possibilitou aos autores relacionar o local de isolamento das cepas ao seu comportamento metabólico, indicando o impacto da escolha das leveduras no aroma do vinho, mesmo que isoladas de microáreas de uma mesma região.

No momento em que se opta pela implantação de culturas puras de *Saccharomyces cerevisiae* para a condução do processo de vinificação, sejam elas selvagens ou comerciais, o produtor deve ter bem definidas as características enológicas da levedura, *i.e.*, seu comportamento fisiológico nas condições da vinificação. Os critérios desta seleção são fundamentados em características relevantes ao processo fermentativo. A determinação destas características em condições laboratoriais fornecem os primeiros resultados para a seleção de leveduras candidatas a iniciar e conduzir a vinificação (RAINIERI; PRETORIUS, 2000; PRETORIUS; HØJ, 2005).

3.4 CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS

3.4.1 Característica *killer*

A capacidade de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sintetizarem e secretarem uma proteína de baixa massa molecular, que inibe o crescimento de leveduras sensíveis, teve suas primeiras descrições na década de 1960 (WOODS; BEVAN, 1968), quando esta proteína foi denominada toxina *killer*. Os estudos que

seguiram este relato evidenciaram que espécies dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, entre outros, também são capazes de sintetizá-la. A base genética para a síntese destas toxinas é variável, podendo a expressão ocorrer por meio do dsRNA de vírus encapsulados (*Saccharomyces cerevisiae* e *Hanseniaspora uvarum*), dsRNA de plasmídeos lineares (*Kluyveromyces lactis*) ou genes nucleares (*Pichia anomala*) (SCHMITT; BREINIG, 2002).

Fenotipicamente, a depender do comportamento do micro-organismo em relação à toxina, estes podem ser classificados com possuidores de fenótipo *killer* (K^+R^+), onde se observam a produção e resistência à ação da toxina; de fenótipo neutro (K^-R^+), quando a levedura é incapaz de sintetizar a toxina, mas é resistente à ação da mesma; e de fenótipo sensível (K^-R^-), onde nem a síntese e nem a resistência à toxina são observadas (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002; SCHMITT; BREINIG, 2002, 2006).

Apesar de inicialmente ser tratada apenas como uma única toxina (WOODS; BEVAN, 1968), em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* já foi relatada a ocorrência de três tipos: toxina *killer* K1, K2 e K28, que podem diferir em modo de ação e pH onde são ativas e estáveis (SCHMITT; BREINIG, 2002, 2006). Apesar de estes tipos ocorrerem naturalmente, novos tipos de toxina *killer*, como *Klus*, são obtidos por engenharia genética e, por ora, são menos comuns (RODRIGUEZ-COUSIÑO *et al.*, 2011).

O modo pelo qual atuam as toxinas *killer* varia em relação ao receptor ao qual se ligam na parede celular. Acredita-se que as toxinas K1 e K2 possuam modos de ação muito semelhantes (Figura 5), ligando-se a receptores ($\beta 1 \rightarrow 6$)-D-glucanos da parede celular de leveduras sensíveis e interagindo com receptores da membrana celular, tornando-a permeável a íons e moléculas de alta massa molecular (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002; GULBINIENE *et al.*, 2004). A toxina K28, por sua vez, possui afinidade com a fração manoproteica da parede celular das leveduras e atua impedindo a síntese de DNA e interrompendo seu ciclo celular (SCHMITT; BREINIG, 2006).

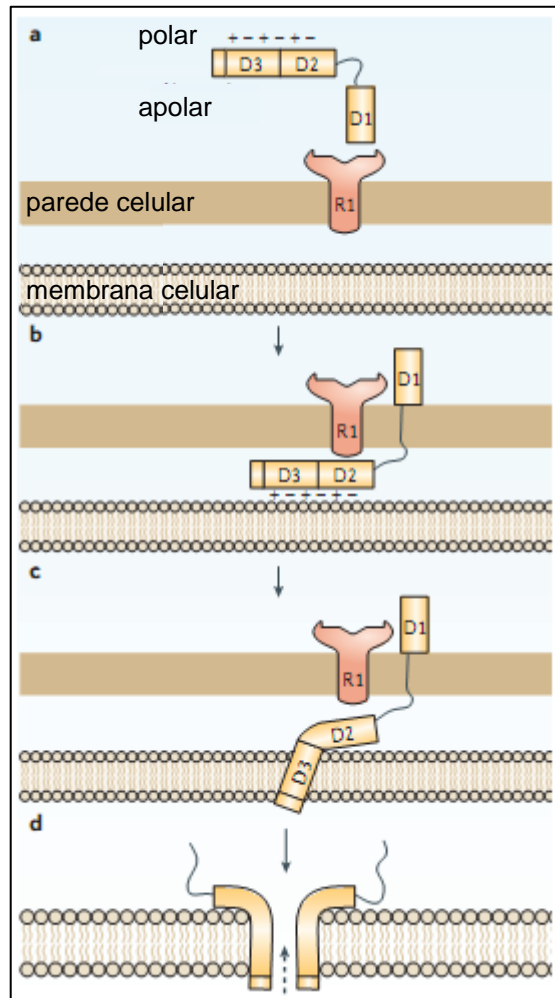


FIGURA 5 - PROPOSTA DO MODO DE AÇÃO DA TOXINA *KILLER K1*

FONTE: Schmitt e Breinig (2006)

NOTA: (a) Domínios da estrutura da toxina e ligação do domínio 1 (D1) ao receptor R1; (b) adsorção inespecífica do sítio apolar da α -hélice (domínio 2; D2) e reconhecimento de possível receptor de membrana ou proteína de ancoragem; (c) inserção do domínio 3 (domínio 3; D3) e formação de hélice transmembrana; (d) oligomerização da toxina e subsequente permeabilização da membrana.

No entanto, é o pH que define o interesse da vinicultura na característica *killer*. Este parâmetro torna a toxina K2 a mais importante no processo de vinificação, já que é estável entre pH 2,9 e 4,8, condizente com o pH do processo. As toxinas K1 e K28, com pouca ou nenhuma atividade na vinificação, são estáveis em pH 4,6 e 6,0, respectivamente (PETERING *et al.*, 1991; VUUREN, H. J. J.; JACOBS, 1992).

No processo de vinificação podem ser observadas interações *killer* estabelecidas por leveduras selvagens entre si ou entre leveduras selvagens e leveduras iniciadoras do processo (LOPES *et al.*, 2006; KAPSOPLOULOU *et al.*, 2008; CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE, 2010). Presume-se, então, que a capacidade de leveduras selecionadas dominarem o processo fermentativo também é afetada pelas características de outras espécies/cepas naturalmente presentes no mosto (FLEET, 2003; LOPES *et al.*, 2006).

A determinação da característica *killer* de cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* presentes em áreas de produção de vinho é imprescindível no caso de cepas comerciais serem utilizadas como iniciadoras do processo (KAPSOPLOULOU *et al.*, 2008; ORLIĆ *et al.*, 2010). Se estas apresentarem o fenótipo *killer*, esperam-se o controle do desenvolvimento de leveduras indesejadas durante os primeiros estágios da fermentação e, por consequência, a prevenção de desvios de qualidade da bebida (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002).

A preocupação com “fermentação prolongada” e “fermentação vagarosa” (tradução livre de *protracted/sluggish fermentation*) é bastante recorrente, em grande parte pela interação *killer* que há entre os micro-organismos presentes no mosto. Estes fenômenos no processo podem ser explicados pela presença de cepas naturalmente presentes na uva que apresentem o fenótipo *killer* e a presença da cepa inoculada com o fenótipo sensível (KAPSOPLOULOU *et al.*, 2008). Com grandes chances de dominar o processo e se desenvolverem no mosto, estas cepas selvagens podem não ser capazes de realizar a fermentação alcoólica em tempo adequado. O resultado é um vinho de baixa qualidade e concentração de açúcar residual elevada.

3.4.2 Síntese de hidrolases

O aspecto, o aroma e o sabor são as principais características que distinguem os vinhos em relação a seu estilo ou local de produção (SWIEGERS *et al.*, 2008). Sabe-se que a microbiota participante do processo de vinificação é capaz de sintetizar uma série de enzimas que atuam em moléculas precursoras oriundas da uva, ativando compostos aromáticos, por exemplo (STRAUSS *et al.*, 2001).

A ação destas enzimas faz com que alguns vinicultores utilizem-nas na forma de preparações industriais (LAO *et al.*, 1997; STRAUSS *et al.*, 2001), mas apesar dos resultados promissores em relação à tecnologia de produção, o preço de se adicionarem enzimas ao mosto ainda pode representar fator impeditivo (SWIEGERS *et al.*, 2008; VAN WYK; DIVOL, 2010). Porém, se por um lado há a possibilidade de se incrementarem características aromáticas da bebida, por outro o fato de haver diferentes enzimas nestas preparações implica em risco de formação de compostos que degradam seu aroma (IRANZO; PÉREZ; CAÑAS, 1998). O fato é exemplificado por Ruiz *et al.* (2010), que citam a ocorrência de antocianases que, se presentes em preparações utilizadas na elaboração de vinhos tintos, podem comprometer a sua coloração por produzirem antocianidinas, instáveis e rapidamente conversíveis a compostos incolores ou marrons.

A produção de enzimas pela própria levedura é de interesse dos vinicultores, uma vez que ajudam a atribuir um diferencial à bebida produzida (IRANZO; PÉREZ; CAÑAS, 1998). Além deste fator, deve ser considerado que neste caso a enzima é produzida como parte do processo, eliminando a necessidade da adição de preparações ao mosto (FERNANDEZ-GONZALEZ *et al.*, 2005). Diversas são as classes enzimáticas de interesse na elaboração do vinho. No entanto, segundo Orlić *et al.* (2010), glucosidases e pectinases estão entre os grupos considerados mais importantes para o processo fermentativo. Jayani, Saxena e Gupta (2005) citam que apenas as pectinases correspondem a 25% do comércio de enzimas utilizadas pela indústria de alimentos.

3.4.2.1 Expressão da enzima β -glucosidase

Está bem estabelecida a participação de compostos voláteis, como monoterpenos, norisoprenoides e derivados benzênicos, no desenvolvimento do aroma dos vinhos (FIA; GIOVANI; ROSI, 2005). Naturalmente encontrados na uva, estes compostos podem se apresentar na forma livre volátil ou na forma glicosídica (ROSI; VINELLA; DOMIZIO, 1994; HERNANDEZ *et al.*, 2003; PÉREZ, G. *et al.*, 2010), sendo que a concentração desta última foi descrita como até 15 vezes maior do que a primeira (SPAGNA *et al.*, 2002).

Na forma glicosídica, que não contribui para o aroma do vinho, a porção aglicona pode estar ligada a β -D-glucose ou aos dissacarídeos 6-O- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranosose, 6-O- α -L-ramnopiranosil- β -D-glucopiranosose ou 6-O- β -D-apiofuranosil- β -D-glucopiranosose (GIL *et al.*, 2005; SWIEGERS *et al.*, 2008), que podem ser convertidas à fração livre, e.g., por hidrólise ácida. Entretanto, já foram reportados resultados de rearranjo de monoterpenos e alteração das características do vinho após este tipo de hidrólise, fazendo com que a prática seja preterida à hidrólise enzimática, que não apresenta nenhum destes reveses (MATEO; STEFANO, 1997; MATEO; JIMÉNEZ, 2000; SWIEGERS *et al.*, 2008).

A hidrólise enzimática envolve duas etapas, conforme ilustrado na Figura 6: na primeira, uma α -L-ramnosidase (EC 3.2.1.40), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) ou β -D-apiofuranosidase (EC 3.2.1.161), a depender da estrutura ligada à porção aglicona, cliva a ligação glicosídica ($\beta 1 \rightarrow 6$); e na segunda, as moléculas de monoterpenil- β -D-glucosídeos são clivadas pela enzima β -glucosidase (EC 3.2.1.21), liberando os monoterpenos (SWIEGERS *et al.*, 2008).

Já durante o amadurecimento das uvas, ocorrem estas etapas pelas β -glucosidases presentes na fruta (SWIEGERS *et al.*, 2008). No entanto, foi demonstrado que tais enzimas perdem praticamente toda a atividade nas condições de vinificação, já que são inibidas em condições de pH 3,0 a 4,0, concentrações de glucose superiores a 1% e crescente teor alcoólico (ROSI; VINELLA; DOMIZIO, 1994; MATEO; STEFANO, 1997; FIA; GIOVANI; ROSI, 2005).

Sintetizada também por micro-organismos residentes na uva, esta enzima já teve reportada a expressão por leveduras dos gêneros *Hanseniaspora*, *Pichia*,

Candida e *Brettanomyces* (SPAGNA *et al.*, 2002; FIA; GIOVANI; ROSI, 2005). Em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* a expressão da enzima β -glucosidase não é tão comum (SPAGNA *et al.*, 2002), com alguns autores indicando menor atividade em relação a leveduras de outras espécies (HERNANDEZ *et al.*, 2003; FIA; GIOVANI; ROSI, 2005). Por outro lado, já foi reportado o isolamento de cepas desta espécie com capacidade de hidrólise de glucosídeos em condições de vinificação e a liberação de quantidades significativamente maiores de terpenos quando comparadas à cepas comerciais utilizadas como controle (PÉREZ, G. *et al.*, 2010).

Mesmo considerando menor atividade, Mateo e Di Stefano (1997) e, posteriormente, Gil *et al.* (2005) reportam a vantagem da enzima β -glucosidase sintetizada por *Saccharomyces cerevisiae* não ser inibida por altas concentrações de glucose do mosto de vinificação, afirmação que é corroborada por Pérez *et al.* (2010) que citam, ainda, a manutenção da atividade em concentrações de etanol entre 10 e 15%. Este fato torna de interesse que se selecionem cepas produtoras desta enzima para a iniciação e condução da vinificação.

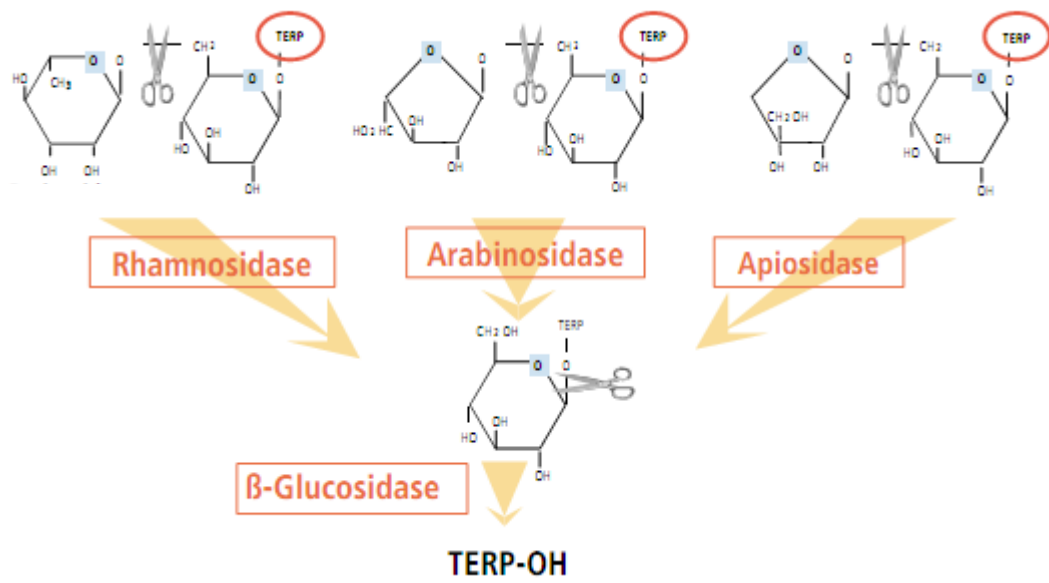


FIGURA 6 - ETAPAS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE TERPENOS

FONTE: Lourens e Pellerin (2004)

3.4.2.2 Expressão de enzimas pectinolíticas

Substâncias pécticas, ou pectinas, referem-se a polissacarídeos de estrutura consistente de uma cadeia formada em grande parte por subunidades metil-esterificadas de ácido galacturônico conectadas por ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) (GAINVORS *et al.*, 1994; BLANCO; SIERO; VILLA, 1999). Presente em plantas superiores, onde está ligada à celulose, a pectina encontra-se na forma insolúvel e confere integridade à parede celular (GAINVORS *et al.*, 1994).

Capazes de degradar as pectinas, as enzimas pectinolíticas ou pectinases são sintetizadas pela própria planta e por alguns micro-organismos. Nas plantas, atuam durante o amadurecimento das frutas, ocasionando modificações estruturais na pectina, tornando-a solúvel e diminuindo a rigidez dos tecidos (KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectinases podem atuar de duas maneiras, sendo classificadas em dois grupos. O primeiro compreende as enzimas desesterificantes (pectinesterases; EC 3.1.1) que catalisam a desmetoxilação das substâncias pécticas, liberando uma molécula de metanol (REVILLA; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 1998, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Já o segundo grupo é formado por enzimas despolimerizantes que hidrolisam as ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) entre os resíduos de ácido poligalacturônico (poligalacturonases; EC 3.2.1) e que catalisam a β -eliminação destes resíduos (pectina liases; EC 4.2.2) (KASHYAP *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2004; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

A obtenção de sucos de uva (seja o produto final, seja o mosto para a vinificação) é resultado da etapa de esmagamento da fruta, processo no qual certa quantidade de pectina pode se incorporar ao suco, aumentando sua viscosidade e dificultando o processo de clarificação (BELARBI *et al.*, 2000).

No processo de elaboração do vinho, as pectinases são normalmente utilizadas nesta etapa, aumentando a fluidez do suco e reduzindo o tempo necessário para sua conclusão; ou após a fermentação do mosto, onde atua na clarificação e no aumento da taxa de filtração da bebida (IRANZO; PÉREZ; CAÑAS, 1998; REVILLA; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). Além das vantagens tecnológicas, o uso de pectinases resulta no aumento da extração de

antocianinas e taninos, desejáveis na composição final do vinho (REVILLA; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 1998, 2003), uma vez que a degradação das pectinas da parede celular permite contato entre os vacúolos que contêm estas moléculas e o mosto (VILANOVA *et al.*, 2000; LOURENS; PELLERIN, 2004).

No caso da utilização de uvas da espécie *V. labrusca*, estas enzimas têm grande importância, uma vez que apresentam teor de pectinas maior se comparadas a uvas da espécie *V. vinifera* (RIZZON; LINK, 2006).

A ação das pectinases, especificamente da poligalacturonase, na clarificação do vinho pode ser explicada pelo fato de que a pectina, carregada negativamente, envolve sólidos carregados positivamente, provenientes da uva após a etapa de esmagamento. A repulsão entre as cargas negativas mantém estes sólidos em suspensão no vinho, causando os problemas citados. Estas enzimas, promovendo a degradação da pectina, causam a exposição gradual das cargas positivas das partículas sólidas da uva. Estas áreas carregadas positivamente iniciam um processo de atração à pectina restante, aumentando a massa molecular do complexo, que tende a precipitar (Figura 7) (LOURENS; PELLERIN, 2004).

Ainda que as uvas sintetizem pectinases, estas têm atividade inibida nas condições de vinificação, principalmente em relação ao pH e presença de dióxido de enxofre (LOURENS; PELLERIN, 2004). Assim, comumente são utilizadas preparações comerciais de pectinases sintetizadas por fungos filamentosos da espécie *Aspergillus niger*.

Apesar de passarem por etapas de purificação, estas preparações ainda possuem atividade detectável de outras enzimas. Lao *et al.* (1997) citam as enzimas com atividade cinamoil esterase, que liberam ácido hidroxicinâmico, convertido pela levedura em fenóis voláteis e que, em altas concentrações, comprometem aroma e sabor da bebida. Outro problema, este representando risco à saúde, é referente à liberação de quantidades consideráveis de metanol na bebida (REVILLA; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, 1998; CHEN, C.-H. *et al.*, 2009), dada a ação de pectinesterases durante os estágios de maceração, fermentação e envelhecimento do vinho.

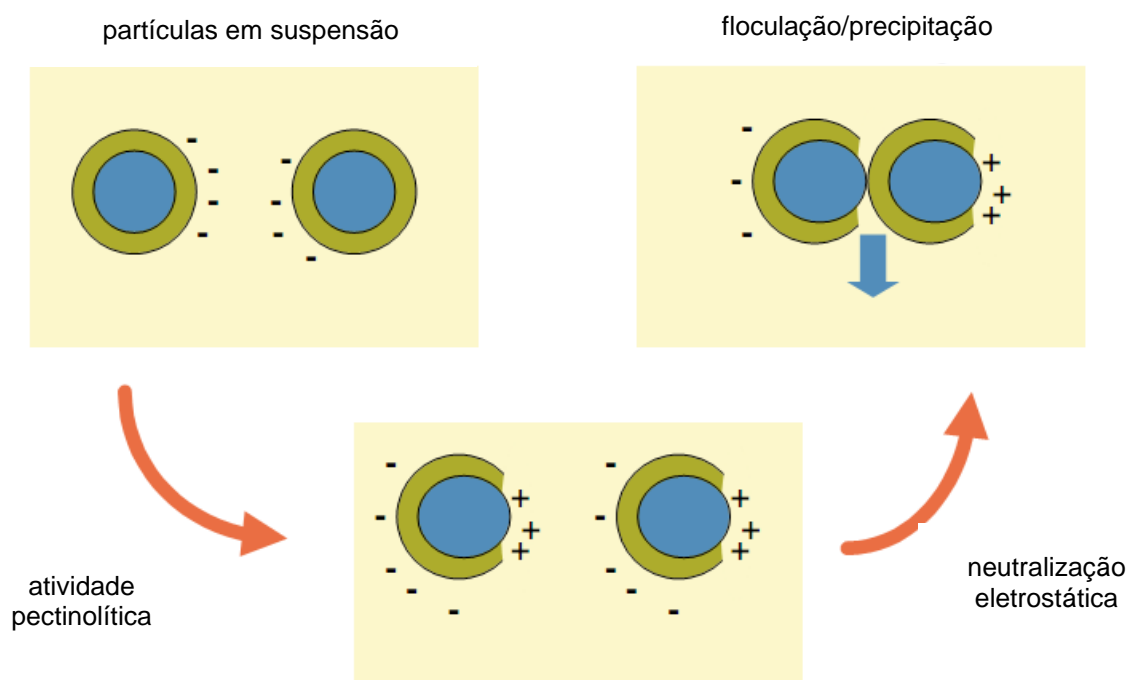


FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ENZIMÁTICA DA ATUAÇÃO DE PECTINASES NA CLARIFICAÇÃO DE VINHOS

FONTE: Lourens e Pellerin (2004)

NOTA: em azul são representadas as partículas sólidas da uva; em verde, a pectina.

A síntese de pectinases por leveduras foi descrita para algumas espécies, como *Kluyveromyces marxianus*, *Cryptococcus albidus* e *Rhodotorula* sp (BLANCO *et al.*, 1997). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a detecção de atividade poligalacturonásica já foi reportada, mas apesar de sua importância na indústria de alimentos, tal atividade foi demonstrada em apenas algumas cepas (MCKAY, 1988; BLANCO *et al.*, 1997).

Poucas cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae* possuem a capacidade de produzir poligalacturonase em meios ricos em glucose, como é o mosto de vinificação (RADOI; KISHIDA; KAWASAKI, 2005b). No entanto, a redução do tempo necessário para filtração do vinho, por reduzir a turbidez e viscosidade e aumentar a fluidez da bebida, após a condução de vinificações com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* produtoras de poligalacturonases é citada na literatura (BLANCO *et al.*, 1997). Outros autores clonaram e expressaram o gene que codifica esta enzima, *PGU1* ou *PGL1*, em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* não produtoras e confirmaram benefícios na qualidade do vinho obtido (VAN WYK; DIVOL, 2010) e vantagem em relação à eficiência do processo fermentativo (VILANOVA *et al.*, 2000; RADOI; KISHIDA; KAWASAKI, 2005a).

A identificação e seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que sejam capazes de sintetizar a enzima poligalacturonase em condições de vinificação pode representar um meio de facilitar a extração de compostos aromáticos e melhorar a eficiência da vinificação sem a adição de preparações enzimáticas (BELARBI *et al.*, 2000; VILANOVA *et al.*, 2000; VAN WYK; DIVOL, 2010).

3.5 IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

A tendência da indústria vinicultora é continuar selecionando novas cepas de leveduras na busca de se melhorar o processo fermentativo de tal forma que confirmem determinadas características de sabor e aroma ao vinho (FLEET, 2008). Logo, a prática requer a utilização de metodologias que possam diferenciar as leveduras inoculadas do restante das leveduras selvagens presentes no mosto para

que se assegure que a fermentação está sendo conduzida pelas leveduras desejadas (TORRIANI *et al.*, 2004; ORLIĆ *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, a identificação de leveduras tem caráter fenotípico onde se analisam propriedades morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, como a capacidade de assimilação e/ou fermentação de diferentes fontes de carbono. Os resultados são, então, comparados com descrições padrão que levam à identificação de gênero e espécie (MONTROCHER *et al.*, 1998; BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000; CHAVAN *et al.*, 2009; SOUCIET *et al.*, 2009). Estas metodologias envolvem a análise de, normalmente, 50 a 100 ensaios, tornando o processo complexo e demorado (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; SALINAS *et al.*, 2009).

O maior problema, no entanto, é que não raramente estes métodos fornecem uma eventual falsa identificação ao nível de espécie ou subespécie (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; MITTERDORFER *et al.*, 2002) dada relação direta que têm com a expressão genética, esta, bastante influenciada pelo ambiente (HERAS-VAZQUEZ *et al.*, 2003; MORRISEY *et al.*, 2004). Estudos de genes cujas enzimas permitem a assimilação de diferentes fontes de carbono, técnica normalmente utilizada para a identificação de espécies, mostraram que sua localização e número cópias podem variar nas subespécies e, por vezes, refletem apenas a adaptação a condições ambientais, e não uma diferenciação taxonômica (MONTROCHER *et al.*, 1998; HAUSER *et al.*, 2001).

Como alternativa, foram desenvolvidas metodologias baseadas em análises de proteínas celulares e ácidos graxos por cromatografia a gás que, no entanto, têm reprodutibilidade questionável por também serem dependentes da fisiologia do micro-organismo (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; DIAS *et al.*, 2003).

Em vista dos reveses apresentados por ensaios unicamente fenotípicos, o uso de técnicas moleculares e, mais recentemente, sua relação com metodologias *in silico*, tem sido cada vez mais difundido (XUFRE *et al.*, 2000; RASPOR; ZUPAN; ČADEŽ, 2007; FRANCO-DUARTE *et al.*, 2009). Os resultados obtidos por meio destas técnicas apresentaram novas perspectivas para a identificação, caracterização e seleção de micro-organismos (PIŠKUR; LANGKJÆR, 2004; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

Sua aplicação tem ocorrido tanto na identificação de micro-organismos de interesse clínico (CHEN, Y.-C. *et al.*, 2001; KUMAR; SHUKLA, 2005; POSTERARO *et al.*, 2005; CIARDO *et al.*, 2006), como também nas pesquisas de cunho industrial, visando controle e melhoria de processos (OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000; RAINIERI; PRETORIUS, 2000).

A indústria do vinho, que tanto depende da interação micro-organismo/tecnologia/uva, não é exceção e faz amplo uso destas ferramentas, seja na identificação taxonômica e determinação da ecologia do processo, seja na identificação e seleção de leveduras com características peculiares em nível subespecífico (BEH *et al.*, 2006; MILLS *et al.*, 2008; ANCÍN-AZPILICUETA; GONZÁLEZ-MARCO; JIMÉNEZ-MORENO, 2010; CSOMA *et al.*, 2010).

3.5.1 DNA ribossomal

Em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o DNA ribossomal (rDNA), que codifica as moléculas de RNA ribossomal (rRNA) que compõem os ribossomos, compreende 150 a 200 cópias *in tandem*, correspondendo a cerca de 60% do cromossomo XII (VENEMA; TOLLERVEY, 1999; JAMES *et al.*, 2009). Tal qual ilustrado pela Figura 8, cada uma destas repetições é formada por quatro genes do rRNA: a subunidade maior (LSU ou 26S rRNA), a subunidade menor (SSU ou 18S rRNA) e os genes 5S e 5.8S. Além disso, fazem parte destas repetições, os espaçadores transcritos internos (*Internal Transcribed Spacers*, ITS) e externos (*External Transcribed Spacers*, ETS), flanqueados por regiões não transcritas (*Non-transcribed Spacers*, NTS) (MONTROCHER *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2006).

A região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA, outrora considerada apropriada para a identificação de micro-organismos, já teve reportada similaridade em micro-organismos diferentes. Entretanto, a região dos ITS tem mostrado apresentar grau apropriado de distinção entre micro-organismos. (MONTROCHER *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2006).

Os espaçadores internos ITS1 e ITS2 permaneceram muito pouco conservados ao curso da evolução (BRUNS; WHITE; TAYLOR, 1991), implicando

em alta variabilidade inter e intraespecífica e, portanto, na aplicabilidade na identificação e diferenciação de micro-organismos (BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1996; GUILLAMÓN *et al.*, 1998; GRANCHI *et al.*, 1999; MITTERDORFER *et al.*, 2002; POSTERARO *et al.*, 2005; CIARDO *et al.*, 2006; RASPOR; ZUPAN; ČADEŽ, 2007). A análise desta região tem sido utilizada com sucesso na identificação de micro-organismos nos mais variados processos industriais (VALENTE *et al.*, 1996; GUILLAMÓN *et al.*, 1998; GRANCHI *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000; BEH *et al.*, 2006; MILLS *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2009).

Dentre as várias metodologias baseadas na PCR, a análise de *Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição*, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), é extensivamente aplicada à identificação de cepas de leveduras, com sucesso e reprodutibilidade bem reportados (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; SABATE *et al.*, 2002; BEH *et al.*, 2006; CARRETO *et al.*, 2008; ÚBEDA; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ; BRIONES, 2009). Resumidamente, a técnica se baseia nas etapas da amplificação do gene alvo por PCR, digestão do *amplicon* com endonucleases de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese em gel e, se cabível, comparação com padrões de restrição de espécies conhecidas (BEH *et al.*, 2006; RASPOR; ZUPAN; ČADEŽ, 2007).

No tocante a pesquisa com leveduras vínicas, a análise por PCR-RFLP dos segmentos ITS foi reportada com sucesso na diferenciação inter e intraespecífica da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1996; MONTROCHER *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; ESTEVE-ZARZOSO; FERNÁNDEZ-ESPINAR; QUEROL, 2004). Esta região também é alvo de estudos para a determinação da ecologia de processos em função do tempo de fermentação (GUILLAMÓN *et al.*, 1998; GRANCHI *et al.*, 1999) ou ainda para o levantamento da ocorrência de micro-organismos em dada região (MARTÍNEZ *et al.*, 2007).

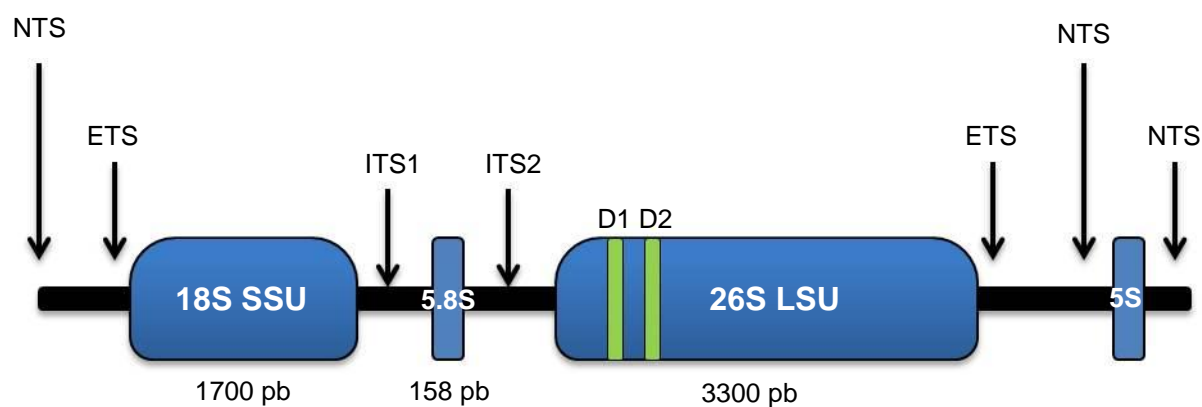


FIGURA 8 - ESTRUTURA DO DNA RIBOSSOMAL DE FUNGOS

FONTE: Adaptado de Fernández-Espinar *et al.* (2006)

NOTA: Estão identificadas as regiões codificadoras para as subunidades 18S, 5.8S, 26S e 5S do rRNA, os espaçadores não transcritos (NTS) e os espaçadores transcritos internos (ITS) e externos (ETS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

O presente trabalho utilizou as cepas de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de seis cantinas rurais localizadas no município de Colombo, estado do Paraná (Figura 9). Estas já tiveram algumas características enológicas determinadas por Guimarães (2005), conforme Tabela 3.

TABELA 3 - CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Cepas	Capacidade de crescimento					Floculação	Produção de H ₂ S
	Etanol (g.l ⁻¹)			Temperatura (°C)			
	100	130	150	37	45		
24	+++	++	+	+++	-	-	-
27	+++	+++	+++	+++	-	+	+
29	+++	++	+	+++	-	-	++
33	+++	-	-	+++	-	-	+
34	+++	+	-	+++	-	-	++
37	+++	-	-	+++	-	-	-
47	+++	-	-	+++	-	-	-
48	+++	-	-	+++	-	-	-
49	+++	+	-	+++	-	-	++
50	+++	-	-	+++	-	-	+
51	+++	-	-	+++	-	-	++
53	+++	++	-	+++	-	-	-
58	+++	-	-	+++	-	-	-
59	+++	+	-	++	-	-	-

NOTA: intenso (+++); moderado (++); fraco (+); ausente (-)

FONTE: Adaptado de Guimarães (2005)

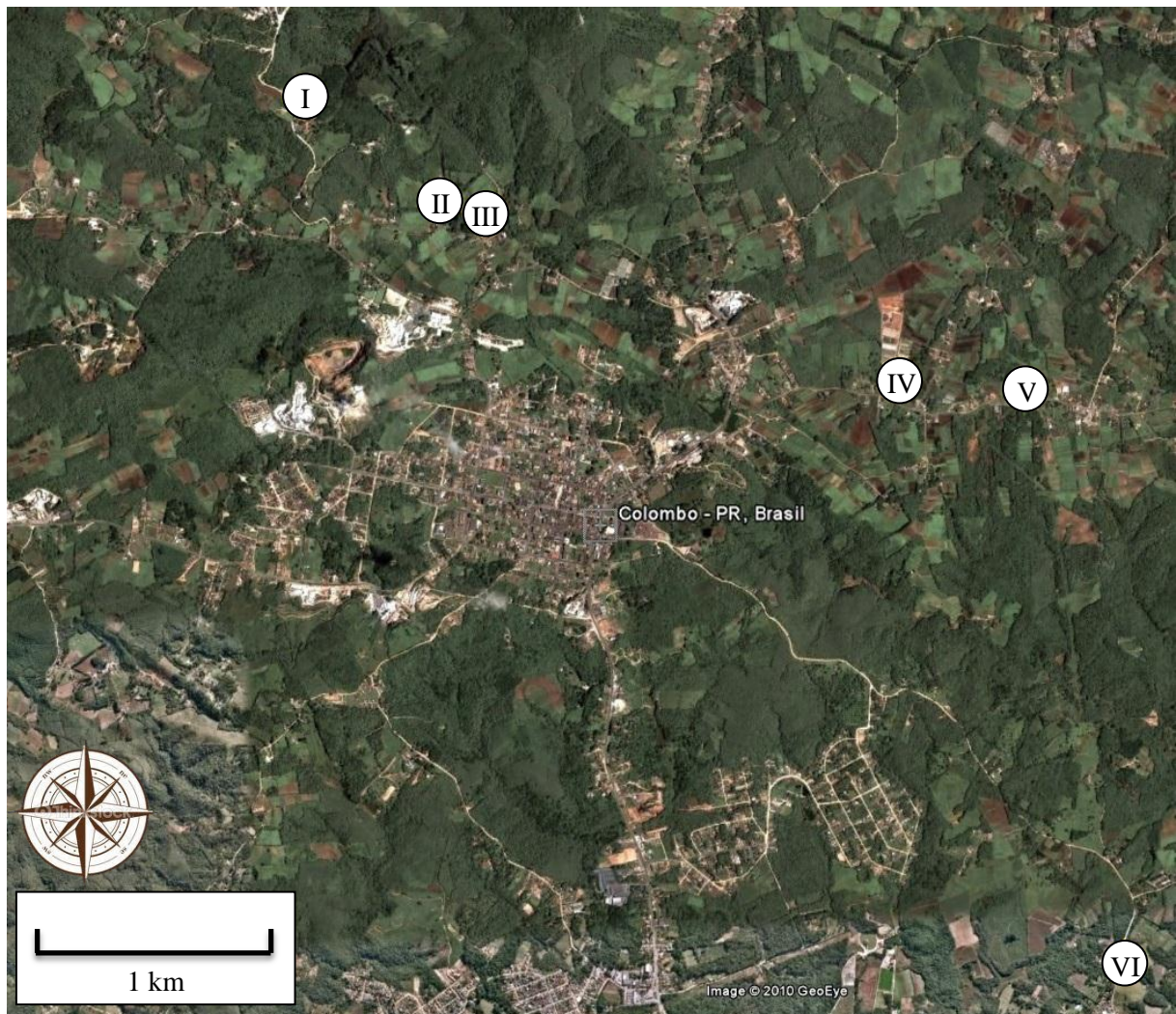


FIGURA 9 - MAPA DO MUNICÍPIO DE COLOMBO COM A LOCALIZAÇÃO DAS CANTINAS RURAIS DE ONDE FORAM ISOLADAS AS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS NESTE ESTUDO

NOTA: Fotografia, escala e orientação baseadas em dados fornecidos pelo software Google Earth 6. Os algarismos romanos representam as cantinas rurais de onde foram isoladas as cepas vínicas.

I – cepas 47, 48 e 49

II – cepas 33 e 34

III – cepas 37, 50 e 51

IV – cepa 58

V – cepas 24, 29 e 59

VI – cepas 27 e 53

4.2 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

A reativação das cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a determinação de suas cinéticas de crescimento foram realizados em frascos de 250 ml contendo meio líquido YEPD a 2% (extrato de levedura 10 g.l⁻¹; glucose 20 g.l⁻¹; peptona 20 g.l⁻¹), previamente preparado e esterilizado a 1 atm e 121 °C por 15 minutos. Os cultivos foram realizados a 28 °C e agitação orbital de 150 rpm. Sempre que utilizado para o crescimento das cepas o meio de cultivo teve seu valor de pH ajustado para 5,50.

O crescimento celular foi verificado por método turbidimétrico, em que um mililitro do cultivo foi coletado em intervalos de duas horas, perfazendo 20 h de ensaio. As células foram lavadas com água destilada e centrifugadas a 3500 rpm por cinco minutos, processo que foi repetido até transparência do sobrenadante. O precipitado de células teve, então, seu volume inicial reconstituído com água destilada para a realização da leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC configurado para comprimento de onda de 650 nm. Foi determinada a cinética de crescimento de cada cepa relacionando os valores de densidade óptica e variação do pH em função do tempo de cultivo.

As culturas puras das cepas vínicas foram mantidas em meio sólido YEPD a 2% em temperatura de -18 °C.

4.3 DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 Extração de material genômico

A metodologia empregada para a extração de DNA foi descrita por Ausubel *et al.* (1999). Cada cepa vínica foi cultivada em meio líquido YEPD a 2% a 28 °C e agitação orbital de 150 rpm. Após as células atingirem a fase final de crescimento

logarítmico, centrifugadas em tubo de polipropileno a 3500 rpm durante cinco minutos e lavadas com água destilada estéril gelada.

As células foram, então, ressuspensas em 200 µl de tampão de extração [Triton X-100 2% (p.v⁻¹); SDS 1% (p.v⁻¹); NaCl 100 mM; Tris pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM], adicionadas de pérolas de vidro estéreis e de 200 µl de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1).

Posteriormente, os tubos de polipropileno contendo o material foram agitados em vórtex durante cinco minutos e acrescentados de 200 µl de tampão TE (Tris pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM). Isto feito, ocorreram, então, a homogeneização por inversão e a centrifugação a 13000 rpm durante cinco minutos. A extração com a solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi realizada duas vezes. A fase aquosa, recolhida em novo tubo estéril de polipropileno de 1,5 ml, foi adicionada de 400 µl de clorofórmio, homogeneizada por inversão e centrifugada a 13000 rpm durante cinco minutos. Em novo tubo estéril de polipropileno, foi recolhida a fase aquosa, a qual foi adicionada de 750 µl de etanol absoluto. Ocorreram novas homogeneização e centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi removido e o precipitado adicionado de um mililitro de solução de etanol a 70% (p.v⁻¹) e centrifugado a 13000 rpm durante dois minutos. O sobrenadante foi separado e o tubo estéril de polipropileno contendo o material genômico permaneceu a 37 °C até eliminação do etanol.

Ao material genômico isolado foram adicionados 30 µl de água ultrapura estéril contendo concentração final de 2,0 µg.ml⁻¹ da enzima ribonuclease A (RNase A). O material permaneceu a 37 °C durante 12 horas. O material foi analisado através de eletroforese em gel de agarose a 0.8% (p.v⁻¹) e, posteriormente, diluído de forma a uniformizar as concentrações. Sua conservação foi realizada a 4 °C.

4.3.2 Amplificação da região rDNA ITS

Para determinar o perfil de PCR-RFLP da região ITS das cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e

NL2 (Sinapse, Brasil) para amplificar um fragmento de cerca de 1200 pb, consistindo as extremidades dos genes 18S e 26S, além de 5.8S, ITS1 e ITS2 íntegros, tal qual descrito por Baleiras-Couto *et al.* (1996). A sequência de cada oligonucleotídeo iniciador e a composição do meio reacional são descritos na Tabela 4.

TABELA 4 – CONDIÇÃO PARA A REAÇÃO DE PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA DAS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* E SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Reagentes	Volume
água ultrapura estéril	q.s.p. 25 µl
[†] tampão <i>Taq</i> DNA polimerase 10x	2,5 µl
cloreto de magnésio 25 mM	1,5 µl
nucleotídeos trifosfatados 5 mM	1,0 µl
oligonucleotídeos iniciadores 10 pmol	1,0 µl
<i>Taq</i> DNA polimerase 5 U/µl	0,2 µl
DNA molde	3,0 a 5,0 µl
Oligonucleotídeos iniciadores	Sequências [‡]
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
NL2	5' CTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCT 3'

[†]Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM

[‡] Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de acordo com Baleiras-Couto *et al.* (1996).

As reações foram realizadas em termociclador Biocycler Peltier Thermal MJ96+/MJ96G. O programa utilizado para a amplificação da região rDNA ITS foi o seguinte: um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por um minuto. Este foi seguido por 35 ciclos de 94 °C por um minuto para a etapa de desnaturação; 54 °C por 30 s para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores; e 72 °C por 1 min e 20 s para a etapa de extensão. Um ciclo adicional de extensão foi realizado a 72 °C por 10 minutos.

A detecção dos produtos de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em solução tampão TBE 1x, segundo Ausubel *et al.* (1999). Uma alíquota de 4,0 µl do produto de PCR foi adicionada de 5,0 µl do tampão de

aplicação F-SUDS [azul de bromofenol a 0,25% (p.v⁻¹), xileno cianol a 0,25% (p.v⁻¹), Ficoll a 25% (p.v⁻¹), SDS a 0,5% (p.v⁻¹), Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0]. As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema horizontal (Horizon 58, Biometra) com diferença de potencial elétrico regulado para 40 V. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador GeneRuler® 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas Life Sciences). Os géis foram corados por 15 minutos utilizando uma solução de brometo de etídio a 0,5 µg.ml⁻¹ e fotodocumentados sob luz UV com comprimento de onda de 365 nm utilizando software LaunchVision Works® LS (EC3 Imaging System, UVP).

4.3.3 PCR-RFLP

O ensaio de PCR-RFLP foi adaptado da metodologia descrita por Baleiras-Couto *et al.* (1996). A digestão enzimática do *amplicon* da região rDNA ITS foi realizada separadamente com as endonucleases de restrição *Tru1*I, isosquizômero de *Mse*I (5' T↓TAA 3'), e *Taq*I (5'T↓CGA 3'), adquiridas de Fermentas Life Sciences. A composição do meio reacional está descrita na Tabela 5. A reação ocorreu por 20 horas a 65 °C.

TABELA 5 - CONDIÇÃO PARA A REAÇÃO DE PCR-RFLP PARA A OBTENÇÃO DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DA REGIÃO ITS rDNA DAS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Reagentes	Volume
água ultrapura estéril	q.s.p. 10,5 µl
tampão para <i>Tru1</i> I [†] ou <i>Taq</i> I [‡]	1,0 µl
<i>Tru1</i> I ou <i>Taq</i> I	1,5 µl
produto de PCR	3,0 a 8,0 µl

[†] Tris-HCl pH 8,5 10 mM; MgCl₂ 10 mM; KCl 100 mM; BSA 0,1 mg.ml⁻¹

[‡] Tris-HCl pH 8,0 10 mM; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM; BSA 0,1 mg.ml⁻¹

O volume total da reação foi adicionado de 5,0 µl do tampão de aplicação F-SUDS e aplicado em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1x (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistema vertical (Mini-Protean® Tetra System, Bio-Rad) com diferença de potencial elétrico regulado para 130 v. Como referência de tamanho molecular foi utilizado o marcador GeneRuler® 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas Life Sciences). A coloração e a fotodocumentação do gel foi feita tal qual descrito no item 4.3.2.

As fotografias digitalizadas tiveram intensidades das bandas comparadas por meio da função de análise de géis do programa ImageJ v.1.44 (Wayne Rasband, National Institute of Health).

4.4 DIFERENCIAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

4.4.1 Determinação da característica *killer*

A determinação da característica *killer* foi adaptada do método descrito por Kapsopoulou *et al.* (2008). As cepas utilizadas como referência para sensibilidade, resistência, produção e não produção de toxina *killer* estão listadas na Tabela 6. No ensaio, realizado em triplicata, foi utilizado meio sólido YEPD 2% modificado (extrato de levedura, 4,0 g.l⁻¹; glucose, 20 g.l⁻¹; peptona, 5,0 g.l⁻¹; ágar 20,0 g.l⁻¹) e mantido em pH 4,20 com tampão acetato a 0,1 M.

TABELA 6 - CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZADAS COMO REFERÊNCIA NA DETERMINAÇÃO DA CARACTERÍSTICA *KILLER*

Micro-organismo	Fenótipo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Uvaferm CK®	K ⁺ R ⁺ , <i>killer</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Uvaferm BDX®	K ⁻ R ⁻ , sensível

FONTE: Lallemand (2010)

A cepa Uvaferm BDX[®] (Lallemand) foi crescida em meio líquido YEPD 2% a 28 °C durante 12 horas e incorporada ao meio do ensaio em concentração igual a 10^5 células por mililitro de meio. Em seguida, este foi distribuído em placas de Petri e, após solidificação, uma suspensão de 20 µl de cada cepa a ser testada foi colocada sobre o meio solidificado e mantida a 28 °C por 48 horas. As cepas foram consideradas produtoras de toxina *killer* (K⁺) quando observada a formação de halo de inibição, evidenciando o não crescimento da cepa sensível à toxina *killer*. Caso contrário, foram consideradas não produtoras (K⁻).

O teste de resistência das cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado tal qual o teste de produção da toxina *killer*, diferindo no micro-organismo incorporado ao meio de cultivo, neste caso, cada uma das cepas teste. No centro do meio solidificado YEPD 2% modificado, foi semeada a cepa Uvaferm CK[®] (Lallemand). Se observado o halo de inibição de crescimento, foi considerada sensibilidade à toxina (R⁻); do contrário, foi considerada resistência (R⁺).

4.4.2 Determinação da capacidade de produção de etanol

A determinação da capacidade de produção de etanol das cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada pela verificação do teor alcoólico (% vol a 20 °C) resultante da fermentação de meio contendo sacarose a uma concentração de 15% (p.v⁻¹). A determinação do teor alcoólico procedeu-se de acordo metodologia oficial (BRASIL, 1986) em ensaio realizado em triplicata.

Cada uma das cepas vínicas foi adicionada ao meio de fermentação (extrato de levedura 10 g.l⁻¹; peptona 20 g.l⁻¹; e sacarose 150 g.l⁻¹) em concentração de 10^6 células por mililitro. A fermentação ocorreu à temperatura de 28 °C e rotação orbital de 100 rpm. Após 20 horas, o líquido fermentado foi centrifugado a 4000 rpm por cinco minutos para a remoção das células e o sobrenadante foi utilizado para a determinação do teor alcoólico. O sobrenadante foi destilado até que se recuperassem 75% de seu volume inicial. O cálculo da densidade relativa levou em consideração a divisão do valor correspondente à massa do destilado pelo valor

correspondente à massa de água, ambos suficientes para preencher o volume total do picnômetro.

A distribuição normal das amostras foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre as médias obtidas das concentrações de etanol, utilizaram-se a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey HSD (Honestly Significantly Different). Foi considerado nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O tratamento estatístico foi realizado pelo programa Microsoft® Office Excel suplementado com o pacote estatístico Action® versão 1.1.

4.4.3 *Screening* para expressão da enzima β -glucosidase

O *screening* para a verificação da expressão da enzima β -glucosidase pelas cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado em duplicata, adaptando-se a metodologia descrita por Fia, Giovani e Rosi (2005). Como referência de *Saccharomyces cerevisiae* produtora de β -glucosidase foi utilizada a cepa Uvaferm CK®.

Primeiramente, as cepas vínicas foram crescidas em meio líquido YEPD 2% a 28 °C e agitação orbital de 150 rpm por 15 horas. Cada uma das cepas foi inoculada em meio líquido composto por base nitrogenada para levedura (YNB) 6,7 g.l⁻¹; glucose 5,0 g.l⁻¹; arbutin 5,0 g.l⁻¹. O meio do ensaio teve o pH ajustado para 5,00 com solução tampão acetato a 0,1 M.

Uma solução de citrato férrico a 1% (p.v⁻¹) foi preparada para ser adicionada ao meio a uma proporção de 1:50. O meio do ensaio e a solução de citrato férrico a 1% (p.v⁻¹) foram esterilizados separadamente por vapor fluente por 30 minutos. Posteriormente, os meios foram reunidos e foi realizada a inoculação de cada micro-organismo, que, então, foram crescidos a 28 °C e agitação orbital de 150 rpm por 48 horas. A hidrólise das moléculas de arbutin pela ação da enzima β -glucosidase foi indicada pelo desenvolvimento da coloração marrom-escura no meio.

4.4.4 *Screening* para expressão de enzimas pectinolíticas

A atividade de enzimas pectinolíticas (poligalacturonase) foi detectada segundo método descrito por McKay (1988) e citado por Gainvors *et al.* (1994). O ensaio foi realizado em triplicata.

Cada uma das cepas teste foi semeada em placas de Petri contendo meio sólido, previamente preparado e esterilizado por vapor fluente por 30 minutos, composto por base nitrogenada para levedura (YNB) 6,7 g.l⁻¹; glucose 10,0 g.l⁻¹; ácido poligalacturônico 10,0 g.l⁻¹; e ágar 20,0 g.l⁻¹. O meio de ensaio teve seu pH ajustado em 5,50 com solução tampão de acetato a 0,1 M.

As placas semeadas permaneceram a 28 °C por cinco dias e, após este período, tiveram a superfície coberta por solução de vermelho de rutênio a 0,1% (p.v⁻¹) durante cinco minutos quando, então, foi retirada com água destilada.

Foi considerada capaz de sintetizar poligalacturonase a cepa vínica presente no meio de cultivo em que pode se observar o halo vermelho-púrpura resultante da incorporação da solução de vermelho de rutênio ao meio de cultivo hidrolisado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIFERENCIAÇÃO GENOTÍPICA DAS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Como em grande parte do país, a vinicultura praticada no município de Colombo, estado do Paraná, é caracterizada por pequenas propriedades, trabalho familiar e, do ponto de vista tecnológico, pelo processo de fermentação espontânea. Por outro lado, há grande interesse na utilização de culturas puras de cepas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* na busca de um processo uniforme e um produto com características bem definidas.

No entanto, mesmo em vista das vantagens desta prática em relação ao processo tradicional, deve ser chamada a atenção para dois fatores: I) o uso da mesma cepa por vários produtores representa risco da diminuição da peculiaridade e da complexidade dos vinhos; II) há a possibilidade da disseminação da nova cepa no ambiente em que está inserida a vinícola ou cantina rural, interagindo e modificando a microbiota das uvas da região (VALERO *et al.*, 2007; CLAVIJO; CALDERÓN; PANEQUE, 2010).

Diante da situação, e com o suporte de publicações relacionando a variação da estrutura populacional de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes regiões (LITI *et al.*, 2009; SCHACHERER *et al.*, 2009) ao impacto que causam no perfil saporífero do vinho, ganha força a proposta da utilização de culturas puras de cepas autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* como micro-organismo iniciador da vinificação (CALLEJON *et al.*, 2010; CAPECE *et al.*, 2010; ORLIĆ *et al.*, 2010; SALINAS *et al.*, 2010). Para tanto, métodos que as identifiquem são imprescindíveis. Referente a isto, a análise de PCR-RFLP tem sido cada vez mais utilizada para a identificação de leveduras em alimentos e bebidas (NAUMOVA *et al.*, 2003; BEH *et al.*, 2006).

No presente trabalho, a extração do material genético foi realizada no momento em que as cepas vínicas atingiram a fase final do crescimento logarítmico, cerca de 12 horas. Neste período de cultivo o valor médio do pH observado para estas cepas foi 5,02 condizente com pH em que há condições ideais para plena atividade metabólica, especialmente síntese de DNA e enzimas. A extração do material genômico neste evita a purificação de proteínas sintetizadas durante a fase estacionária que dificultam sua amplificação, seja afetando o anelamento de oligonucleotídeos iniciadores, seja diminuindo a atividade da enzima *Taq* DNA polimerase (BEH *et al.*, 2006).

Para a diferenciação das cepas vínicas deste trabalho, foi utilizada a reação de PCR-RFLP com a digestão da região rDNA ITS pelas enzimas de restrição *TaqI* e *Tru1I*. Polimorfismos podem ser classificados em transição, transversão ou inserção e deleção. Independentemente da classificação, a ocorrência de qualquer tipo de polimorfismo em nucleotídeos que façam parte do sítio reconhecido pela enzima de restrição impede a clivagem do DNA pela mesma, alterando o padrão em que as bandas se apresentam no ensaio de PCR-RFLP.

Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e NL2 permitiram a amplificação parcial dos genes 18S e 26S e integral do gene 5.8S e das regiões ITS1 e ITS2. O *amplicon* referente à região rDNA ITS de cada cepa vínica, de cerca de 1200 pb (Figura 10), é condizente com o que há relatado para leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1996).

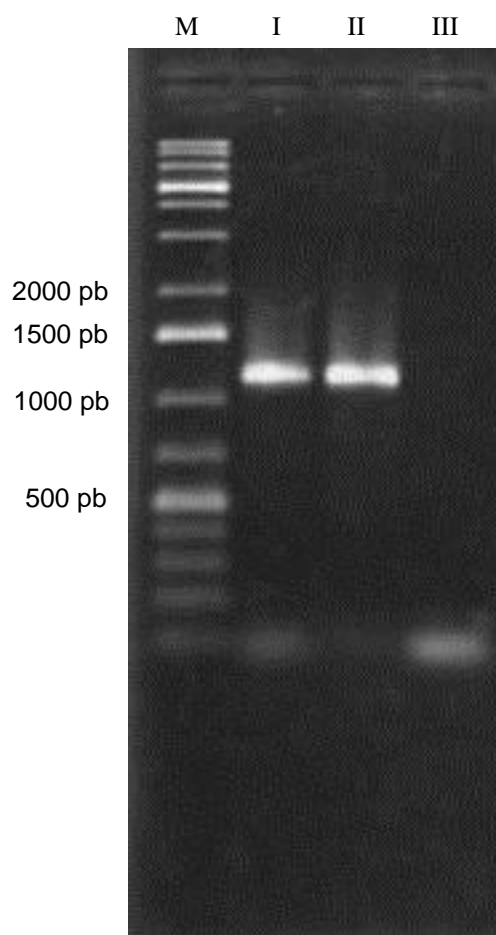


FIGURA 10 – PRODUTOS DE PCR DA REGIÃO rDNA ITS COM OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES ITS1 E NL2

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Fotografias de eletroforese em gel de agarose a 1%, padrão representativo das cepas analisadas. As linhas I e II são referentes à banda da região rDNA ITS da cepa vínica 27. A linha III é referente ao branco, onde nenhum material genômico foi adicionado. A linha M refere-se ao marcador de tamanho molecular GeneRuler® 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas).

Os tamanhos dos fragmentos citados no decorrer do texto que discute os resultados das reações de PCR-RFLP utilizando ambas as enzimas, *TaqI* e *TruI*, são apenas aproximados. No entanto, em tentativa de manter a coesão e evitar repetições no texto, os tamanhos dos fragmentos são tratados como exatos.

A Figura 11 apresenta o perfil eletroforético da região rDNA ITS após digestão com a enzima de restrição *TaqI*. A análise visual da fotografia digitalizada do gel de eletroforese indicou a existência de vários fragmentos de DNA que apresentaram tamanhos entre 60 e 290 pb. Quatro padrões distintos de restrição foram identificados. Os fragmentos de cerca de 290, 270, 150, 130 e 70 pb são comuns a todas as cepas vínicas. O fragmento de 60 pb mostrou-se ausente em apenas um caso, caracterizando a cepa 49, formando o grupo A.

Para as cepas vínicas restantes, foram observadas diferenças na intensidade dos fragmentos de 60 e 70 pb. A maioria das cepas, 24, 27, 33, 37, 47, 48, 50, 53 e 58, apresentou a banda referente ao fragmento de 60 pb mais intensa do que a banda referente ao fragmento de 70 pb, constituindo o grupo B. Fato contrário foi observado nas cepas 34 e 51, caracterizando o grupo C. O grupo D foi composto pelas cepas 29 e 59, as quais apresentaram as bandas dos fragmentos de 60 e 70 pb com mesma intensidade. Sugere-se que a variação de intensidade nestes fragmentos seja explicada pela presença de polimorfismo no sítio de restrição da enzima *TaqI*, de tal modo que esteja presente em algumas parcelas das mais de 100 cópias do rDNA.

As fotografias digitalizadas do gel de eletroforese também foram analisadas pelo programa ImageJ (National Institute of Health), que atribuiu valores às intensidades das bandas obtidas (unidades arbitrárias, u.a.), conforme Tabela 7. A proximidade das bandas de 290 e 270 pb impossibilitou a determinação de suas intensidades de forma isolada. Logo, considerou-se o somatório de ambas. Nesta análise foram consideradas as relações entre a intensidade de banda dos fragmentos de maior (290 e 270 pb) e menor (70 ou 60 pb) tamanho molecular, o que permitiu minimizar eventuais efeitos da variação da concentração de DNA utilizada para a reação de PCR-RFLP na definição dos perfis apresentados pelas cepas.

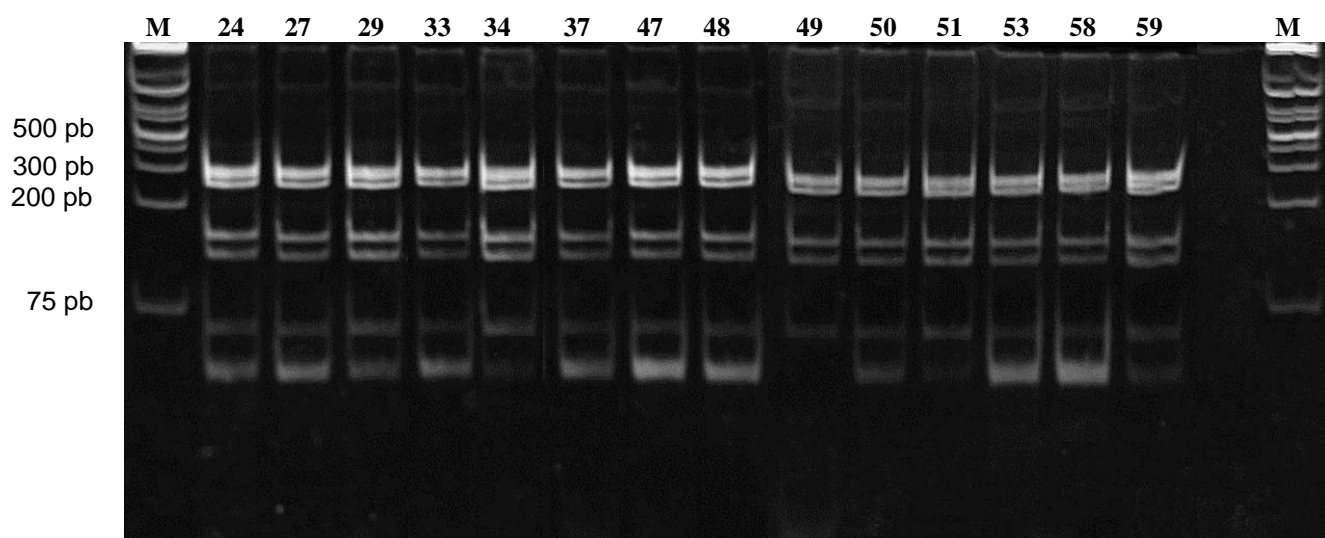


FIGURA 11 - PERFIL ELETROFORÉTICO (MONTAGEM DE DOIS GÉIS) DA REGIÃO rDNA ITS CLIVADA PELA ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO *TaqI*

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Fotografias de eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10%. Os números apresentados sobre as linhas representam as cepas vínicas. As duas linhas M indicam o marcador de tamanho molecular GeneRuler® 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas).

TABELA 7 - INTENSIDADE DAS BANDAS DOS FRAGMENTOS CONSIDERADOS PARA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA APÓS PCR-RFLP COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *TaqI*

Cepa vínica	Grupo proposto	Intensidade das bandas de 290 e 270 pb (u.a.)	Intensidade da banda de 70 pb (u.a.)	Intensidade da banda de 60 pb (u.a.)
24	B	12124,953	767,456	2493,255
27	B	9840,518	638,042	3089,790
29	D	11475,418	1060,577	1576,477
33	B	7624,740	313,213	2470,134
34	C	11841,296	966,820	370,385
37	B	7937,740	346,556	2404,012
47	B	11159,882	535,213	4881,326
48	B	10204,175	531,627	3875,790
49	A	7167,054	459,627	0
50	B	6470,569	387,920	916,062
51	C	6998,933	567,042	112,364
53	B	7293,225	358,385	3483,326
58	B	6881,397	308,749	4462,447
59	D	9701,882	580,335	489,456

FONTE: O autor (2011)

A análise densitométrica revelou a que relação entre a intensidade das bandas dos fragmentos de maior tamanho molecular entre as cepas vínicas 24 e 49 é igual a 1,7, valor que se repete quando a relação foi calculada entre a intensidade da banda do fragmento de 70 pb das duas cepas. Seria, portanto, esperada a manutenção desta relação pela presença de uma banda referente ao fragmento de 60 pb da cepa 49 com intensidade aproximada de 1400 u.a.. Entretanto o programa não identifica banda alguma.

Para que se eliminasse o risco da ausência desta banda ter sido causada pela variação na concentração de DNA aplicada no gel, foi realizada a comparação com uma cepa vínica que apresentasse bandas dos fragmentos 290/270 pb e 70 pb com intensidades similares às da cepa vínica 49, neste caso, a cepa vínica 51. O que se observou no perfil eletroforético desta última, foi uma banda do fragmento de 60 pb com baixa intensidade, porém visível. Desta maneira, eliminou-se o risco da ausência da banda ter sido causada pela variação na concentração de DNA aplicada ao gel, o que torna a cepa vínica 49 a única representante do grupo A.

A análise densitométrica também confirma o agrupamento das cepas vínicas 24, 27, 33, 37, 47, 48, 50, 53 e 58 no grupo B, com base na menor intensidade da banda do fragmento de 70 pb se comparada à banda do fragmento de 60 pb. Neste caso, a relação entre as intensidades das bandas dos fragmentos citados permaneceu sempre entre 0,1 e 0,4, dados de acordo com a análise visual.

Para as cepas vínicas 34 e 51, grupo C, onde a banda do fragmento de 70 pb teve maior intensidade quando comparada à banda do fragmento de 60 pb, a relação foi inversa, como esperado, resultando em 2,6 e 5,0, respectivamente. Para as duas cepas vínicas alocadas no grupo D, cepas 29 e 59, as bandas dos fragmentos de 70 e 60 pb tiveram confirmadas a intensidade semelhante uma vez que a relação entre ambas resultou em valor próximo a 1,0, sendo 0,7 para a cepa 29 e 1,2 para a cepa 59.

Desta maneira, tem-se que a análise densitométrica confirmou a diferenciação das 14 cepas vínicas estudadas em quatro grupos, conforme as diferenças nos padrões de restrição.

A Figura 12 apresenta o perfil eletroforético da mesma região citada, porém após digestão com a enzima de restrição *Tru1*I. A fotografia digitalizada do gel de eletroforese indica a existência de fragmentos de DNA que apresentaram tamanhos

aproximados entre 60 e 350 pb. Três padrões distintos de restrição foram identificados. Da mesma forma que após clivagem com a enzima *TaqI*, o fragmento de 60 pb mostrou-se ausente em apenas um caso, caracterizando a cepa 49 (Figura 12), formando o grupo A. As outras bandas, de aproximadamente 350, 210, 190, 150, 130 e 110 foram comuns a todas as cepas vínicas. As cepas 34, 51 e 59 (Figura 12) apresentaram a banda do fragmento 60 pb com menor intensidade quando comparadas às outras. Logo, as primeiras compuseram o grupo B e as últimas, o grupo C.

Tal qual reportado para a confirmação dos grupos identificados pela análise visual dos perfis eletroforéticos obtidos com a enzima de restrição *TaqI*, o programa ImageJ (National Institute of Health) foi utilizado para a análise densitométrica do perfil eletroforético obtido com a enzima *Tru1I*. A Tabela 8 apresenta as intensidades de banda dos fragmentos de 350 e 60 pb, consideradas para tal fim.

Novamente, foi confirmada a cepa 49 como representante única do grupo A, dada ausência de banda de fragmento correspondente a 60 pb. As cepas vínicas 37 e 50 apresentaram a banda do fragmento de 350 pb com intensidade semelhante à cepa 49 (cerca de 2800 u.a.), todavia, nestas cepas também foi detectada a banda de 60 pb com intensidade razoável, o que não ocorreu no perfil eletroforético da cepa vínica 49. Esta comparação elimina a possibilidade de a ausência da banda de 60 pb da cepa vínica 49 ser influência da variação da concentração de DNA aplicado no gel.

Os grupos B e C foram propostos, pela análise visual, levando-se em consideração a diferença da intensidade da banda do fragmento de 60 pb entre as cepas. No caso do grupo B, as cepas vínicas 34, 51 e 59 apresentaram esta banda com menor intensidade, fato confirmado pela análise densitométrica, uma vez que o resultado da relação média entre as intensidades das bandas dos fragmentos de 350 e 60 pb foi cerca 5,5 para estas três cepas.

Tratando-se das cepas vínicas 24, 27, 29, 33, 37, 47, 48, 50, 53 e 58, a mesma relação teve valor médio de 1,5 para cada cepa fazendo com que fossem alocadas no grupo C, com a premissa de terem a banda do fragmento de 60 pb mais intenso quando comparadas ao grupo B.

Novamente, os três grupos propostos por meio de análise visual foram confirmados pela análise densitométrica.

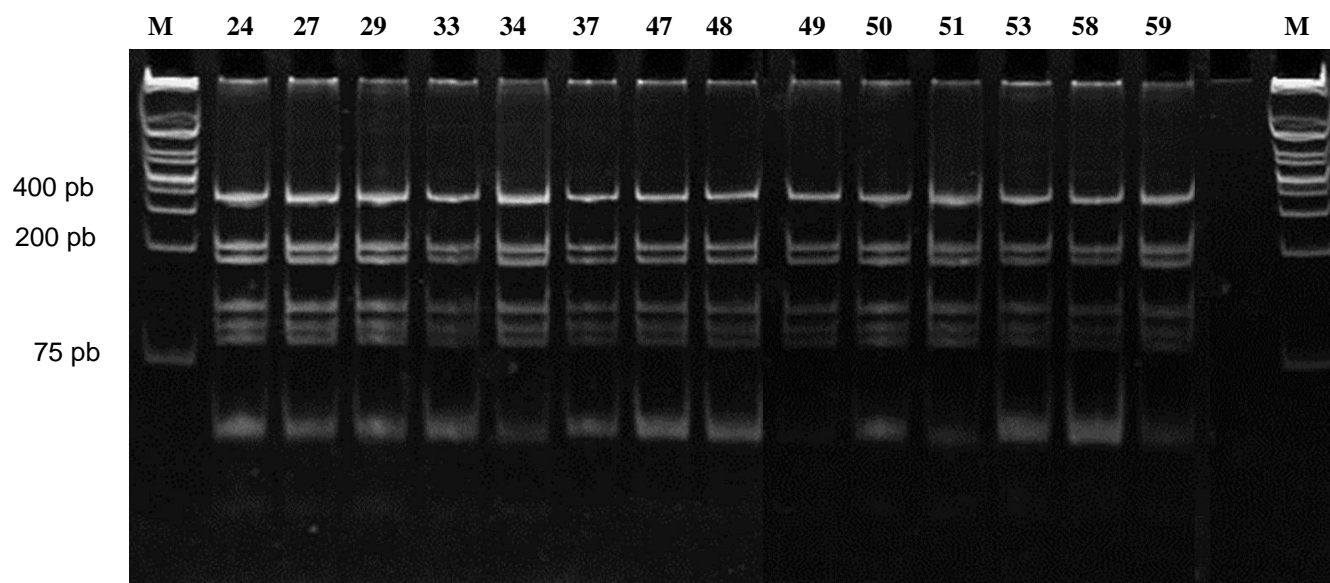


FIGURA 12 - PERFIL ELETROFORÉTICO (MONTAGEM DE DOIS GÉIS) DA REGIÃO rDNA ITS CLIVADA PELA ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO *Tru1I*

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Fotografias de eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10%. Os números apresentados sobre as linhas representam as cepas vínicas. As duas linhas M indicam o marcador de tamanho molecular GeneRuler® 1 kb Plus DNA ladder (Fermentas).

TABELA 8 - INTENSIDADE DAS BANDAS DOS FRAGMENTOS CONSIDERADOS PARA ANÁLISE DENSITOMÉTRICA APÓS PCR-RFLP COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Tru1I*

Cepa vínica	Grupo proposto	Intensidade da banda do fragmento de 350 pb (u.a.)	Intensidade da banda do fragmento de 60 pb (u.a.)
24	C	5590,548	3776,497
27	C	5730,719	2482,497
29	C	5526,962	2670,083
33	C	3484,406	3014,033
34	B	5836,548	1002,062
37	C	2884,698	2003,598
47	C	3294,406	3496,205
48	C	3303,234	2966,912
49	A	2976,820	0
50	C	2764,991	1699,355
51	B	4439,033	703,113
53	C	3101,820	2693,548
58	C	2734,406	3902,397
59	B	3639,770	778,577

FONTE: O autor (2011)

O termo polimorfismo parcial de único nucleotídeo (tradução livre de *partial single nucleotide polymorphism*, pSNP) foi introduzido por James *et al.* (2009) para descrever polimorfismos que não se repetem em partes do genoma que apresentam diversas cópias, como é o caso do rDNA. O fato pode ser resultante de casos onde o polimorfismo ainda não se espalhou por todas as cópias ou o contrário, casos em que ainda não foi eliminado de todas elas. Os autores ainda relatam que em estudo contemplando 34 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, 69% dos polimorfismos identificados foram classificados como pSNP, ocorrendo tanto em regiões mais conservadas (genes 18S e 26S), quanto em regiões menos conservadas (ITS1).

Montrocher *et al.* (1998) já haviam publicado resultados que fornecem suporte a esta hipótese quando não obtiveram sucesso no sequenciamento da região ITS da cepa CBS1171 de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo a existência de mais de um tipo desta região no genoma.

Liti *et al.* (2009) e Sipiczki (2010) consideram a divisão do genoma de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nos tipos normal ou mosaico. O primeiro tipo de genoma foi citado como “limpo”, nas palavras dos autores. O segundo, menos ordenado, pode ter resultado do tráfego do homem e consequente disseminação de algumas cepas em novas regiões e posterior recombinação com aquelas que já habitavam o local.

O fato de James *et al.* (2009) terem observado relação entre o tipo de genoma e o número de pSNP, onde genomas do tipo mosaico apresentam maior ocorrência de polimorfismos, fornece maior suporte para a proposta de agrupamento das cepas vínicas de Colombo que apresentaram pSNP. Aceitando o fato de que a tradição vitivinicultora da população de ascendência italiana que habita o município ter disseminado cepas da levedura na região (leveduras provenientes de equipamentos utilizados na vinificação, por exemplo), possibilita a suposição de que parte destas cepas têm genomas do tipo mosaico e, portanto, sejam mais susceptíveis à ocorrência de pSNP do que outras e, assim, sejam agrupadas separadamente.

Combinando os resultados obtidos com as duas enzimas de restrição são possíveis cinco agrupamentos, como pode ser observado na Tabela 9.

TABELA 9 - PADRÕES DE RESTRIÇÃO OBTIDOS COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO *TaqI* E *TruI*.

Cepas vínicas	Padrão do PCR-RFLP		Padrão combinado
	<i>TaqI</i>	<i>TruI</i>	
24	B	C	I
27	B	C	I
29	D	C	II
33	B	C	I
34	C	B	III
37	B	C	I
47	B	C	I
48	B	C	I
49	A	A	IV
50	B	C	I
51	C	B	III
53	B	C	I
58	B	C	I
59	D	B	V

NOTA: Aos mesmos padrões de restrição foram atribuídas as mesmas letras do alfabeto latino. Algarismos romanos foram atribuídos à combinação dos padrões obtidos com cada uma das enzimas de restrição.

Os resultados, portanto, estão de acordo com estudos de estrutura populacional de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* conduzidos em diversas outras áreas vinícolas, onde é reportada, em quantidade considerável, a variedade de cepas entre estas regiões ou até mesmo em vinícolas de uma só região, como é o caso.

A diferenciação das cepas próprias da região, tanto em relação à análise de PCR-RFLP apresentada neste estudo quanto PCR-RAPD apresentada por Guimarães (2005), poderá ser utilizada no rastreamento de eventuais contaminações e na verificação de que determinada vinificação está sendo conduzida, de fato, pela cepa inoculada.

5.2 DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES ENOLÓGICAS

Na ocasião do primeiro estudo das características enológicas das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho, Guimarães (2005) determinou a capacidade de crescimento em diferentes temperaturas e concentrações de etanol, a capacidade de floculação, a produção de sulfeto de hidrogênio e a assimilação de diferentes fontes de carbono. Uma síntese das conclusões obtidas quando da realização daquele estudo é apresentada pela Tabela 3, item 4.1 desta dissertação.

O presente estudo objetivou, além da diferenciação genotípica, a determinação de outras propriedades enológicas das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da região com o intuito de que estas possam retornar na forma de culturas puras aos produtores do município que desejarem conduzir vinificações com cepas autóctones selecionadas.

5.2.1 Verificação da característica *killer*

O fenótipo *killer* é a característica que algumas cepas de micro-organismos possuem em secretar uma toxina proteica e eliminar micro-organismos sensíveis à mesma; de certa forma, é uma vantagem competitiva que alguns micro-organismos possuem (PÉREZ, F.; RAMÍREZ; REGODÓN, 2001).

A presença de cepas *killer* na vinificação é de grande importância principalmente quando há o emprego de leveduras selecionadas. Estas, se sensíveis à toxina podem ser suprimidas por eventuais cepas *killer* naturalmente presentes na uva ou, que por ventura, estivessem presentes nos equipamentos utilizados no processo. Por outro lado, se as cepas selecionadas possuírem o fenótipo *killer*, há grande probabilidade de impedirem o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis e dominarem o processo com maior facilidade.

Vuuren e Wingfield (1986) estudaram cinco processos de produção de vinho que foram prolongados pela interação entre as leveduras residentes das uvas do local (K^+R^+) e a levedura comercial *Gesenheim* (K^-R^-), utilizada como iniciadora dos

processos. O estudo relata a viabilidade de apenas 30% das leveduras comerciais após 3 dias de fermentação, quando fizeram parte ambas as cepas. Em experimento controle, sem presença da cepa *killer*, e no mesmo tempo de processo, a viabilidade das cepas *Gesenheim* foi próxima do total, 97%.

A magnitude do efeito causado pelas toxinas *killer* depende de alguns fatores, entre eles a concentração inicial das cepas selecionada a ser inoculada na vinificação. Se, por um lado, inóculos concentrados de leveduras selecionadas e de fenótipo sensível já tiveram sucesso reportado em relação à competição com leveduras *killer* pelos nutrientes do mosto (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002), por outro, há publicações relatando o domínio de cepas com o fenótipo *killer* em concentrações iniciais de 0,1 a 10% (PÉREZ, F.; RAMÍREZ; REGODÓN, 2001). Independentemente da situação, sugere-se que a utilização de cepas *killer* iniciadoras do processo seja bem esclarecida à comunidade produtora.

A verificação da característica *killer* teve por base a semeadura de duas cepas, teste e referência, em uma mesma placa de Petri. O pH do meio foi mantido em 4,20 para que a atividade *killer* fosse atribuída apenas à toxina K2, única toxina *killer* ativa nesta condição (MARQUINA; SANTOS; PEINADO, 2002; DABHOLE; JOISHY, 2005).

Gulbiniene *et al.* (2004) e Kapsopoulos *et al.* (2008) relacionaram o diâmetro do halo a intensidade da característica. Diferentemente dos critérios adotados por estas publicações, a verificação da ocorrência do caráter *killer* reportada nesta dissertação foi apenas qualitativa. Os resultados são ilustrados na Figura 13 e reunidos na Tabela 10.

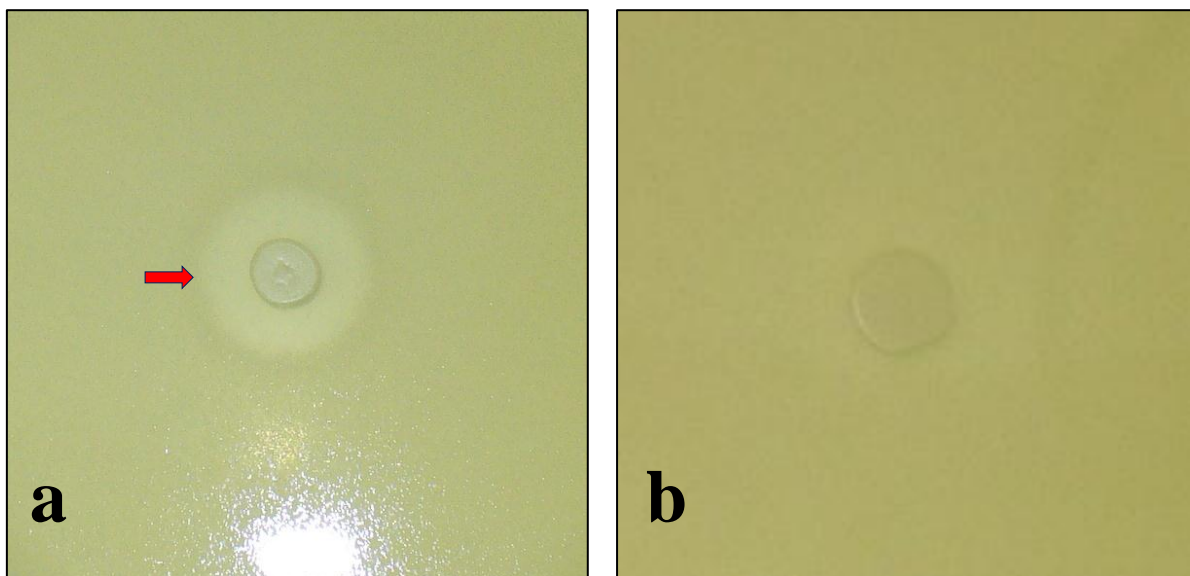


FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS PARA VERIFICAÇÃO DE PRODUÇÃO E RESISTÊNCIA À TOXINA *KILLER*.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As fotos ilustram a formação (a) e a ausência (b) do halo de inibição de crescimento. A seta vermelha em (a) indica o limite do halo de inibição de crescimento da cepa sensível. O resultado deve ser interpretado tal qual descreve o item 4.4.1.

Dez cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* (71,4%) inibiram o crescimento da cepa sensível Uvaferm BDX[®], e foram consideradas, portanto, sintetizadoras da toxina *killer*, K⁺. As quatro cepas vínicas restantes (28,6%) em que não se observou a formação do halo de inibição foram consideradas não produtoras, K⁻. Detectada a incapacidade de síntese da toxina, fez-se necessária a verificação de imunidade à mesma para a determinação do fenótipo como neutro (K⁻R⁺) ou sensível (K⁻R⁻).

Todas as cepas que apresentaram a característica *killer* tiveram confirmada a imunidade à toxina (BREINIG *et al.*, 2006). Das quatro cepas vínicas as quais se atribuiu a característica K⁻, três foram consideradas como resistentes à toxina *killer* secretada pela cepa Uvaferm CK[®] e apenas uma foi considerada sensível. Combinando os dois ensaios, a dez cepas vínicas foi atribuído o fenótipo *killer*, K⁺R⁺; a três cepas, o fenótipo neutro, K⁻R⁺; e a uma cepa, o fenótipo sensível, K⁻R⁻ (Tabela 10).

TABELA 10 – VERIFICAÇÃO DA CARACTERÍSTICA *KILLER* EM CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Cepas vínicas	Fenótipo
24	K ⁻ R ⁻
27	K ⁻ R ⁺
29	K ⁻ R ⁺
33	K ⁺ R ⁺
34	K ⁺ R ⁺
37	K ⁺ R ⁺
47	K ⁺ R ⁺
48	K ⁻ R ⁺
49	K ⁺ R ⁺
50	K ⁺ R ⁺
51	K ⁺ R ⁺
53	K ⁺ R ⁺
58	K ⁺ R ⁺
59	K ⁺ R ⁺

A ocorrência da maioria das cepas apresentando o fenótipo *killer* está de acordo com o que foi revisado por Marquina, Santos e Peinado (2002), onde os autores comentam que a alta frequência do fenótipo *killer* em cepas selvagens pode

ser justificada pela vantagem que este fenótipo confere na competição por substrato e interação com outros micro-organismos, seja em habitat natural, seja no processo de vinificação. A hipótese é corroborada por Iranzo, Pérez e Cañas (1998), que realizaram a verificação do fenótipo *killer* em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de três vinícolas da região de Valdepeñas, Espanha, e reportaram a ausência de cepas com fenótipo sensível. Os resultados indicaram o domínio das cepas com fenótipo *killer*, que aparecem com frequência de 62%.

Rodríguez *et al.* (2010), obtiveram resultado semelhante quanto à ocorrência de cepas com o fenótipo sensível, mas nesta ocasião, observaram que a totalidade das cepas isoladas da região de Cádiz, Espanha, apresentaram fenótipo *killer*. A ausência de cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* com o fenótipo sensível também é reportada por Csoma *et al.* (2010). Entretanto, ao contrário dos estudos citados, os autores observaram a dominância de cepas com o fenótipo neutro, relatando a ocorrência de apenas uma cepa com fenótipo *killer*.

Resultados opostos foram reportados em outras ocasiões. Sangorrín *et al.* (2007) constataram que 18 (69,2%) das 26 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de vinícolas da região da Patagônia, Argentina, foram sensíveis à toxina *killer*, enquanto que Orlić *et al.* (2010) relataram a inabilidade de todas as cepas analisadas em produzir a toxina *killer*.

Em relação à distribuição desta característica em função das cantinas rurais de onde foram isoladas (para localização das cantinas, vide item 4.1), pode-se notar que cepas do fenótipo *killer* foram detectadas em todas as localidades, seja este o único fenótipo detectado (cantinas rurais II, III e IV) ou em conjunto com cepas com fenótipo neutro (cantinas I e VI). Fato que chamou a atenção foi a coexistência dos três fenótipos na cantina rural V.

Kapsopoulos *et al.* (2008) verificaram a ocorrência de cepas com características *killer* isoladas de processos de fermentação espontânea em diferentes regiões vinícolas da Grécia. Na publicação, os autores descrevem a coexistência dos três fenótipos e suas frequências. Em quatro, das sete regiões analisadas, as cepas com fenótipo *killer* foram dominantes, enquanto que em outra região, denominada Nemea 2, houve maior ocorrência de cepas de fenótipo neutro. Em uma ocasião, na ilha vulcânica de Santorini, todas as cepas isoladas possuíam o fenótipo sensível.

As características de clima do estado do Paraná e das próprias uvas da espécie *V. labrusca* conferem a elas menor concentração de açúcares. Dorneles (2003) e Guimarães (2005) verificaram o teor de açúcares nos sucos de uvas Terci (safras 2002 e 2003) de Colombo, PR, e relatam estes valores como 14,5 e 12,1 °Bx, respectivamente. A safra de 2009, por sua vez apresentou valor médio de 15,4 °Bx. À exceção do último, os valores são menores do que aqueles normalmente encontrados em uvas maduras, 15 a 19 °Bx (CHOCIAI *et al.*, 2000).

Ponderando-se que a legislação determina que vinhos de mesa devam ter teor alcoólico entre 8,6 e 14% (v.v⁻¹) (BRASIL, 2004), que 90% da massa dos sólidos solúveis da uva correspondem a açúcares fermentáveis e que, teoricamente, 51,5% (p.p⁻¹) desta massa é convertida a etanol (ZOECKLEIN *et al.*, 2001), a concentração de açúcar no mosto de vinificação deve permanecer entre 20 e 26 °Bx.

O fato torna a prática da chaptalização, processo no qual uma solução de sacarose é adicionada ao mosto, indispensável às vinificações do município (MARTIN, 1990; CHOCIAI *et al.*, 2000).

Considerando que há a possibilidade de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* apresentar fenótipo *killer* e baixa capacidade de produção de etanol, resultando em uma fermentação possivelmente lenta e, desta forma, indesejada, foi verificada a habilidade de leveduras utilizadas na elaboração de vinhos da região em produzir etanol a partir de sacarose. Os resultados de concentração de etanol foram comparados entre cepas vínicas e a cepa comercial Uvaferm CK[®].

A concentração média de etanol obtida após 20 horas de fermentação da cepa Uvaferm CK[®] foi 8,3% vol a 20 °C. No período observado a produção de etanol não diferiu significativamente entre a cepa comercial e as cepas vínicas 34, 37, 47, 51, 53 e 58 ($p < 0,05$). Por outro lado, as cepas vínicas restantes, 24, 27, 29, 33, 48, 49, 50 e 59, apresentaram produção de etanol significativamente maior quando comparadas à cepa comercial ($p < 0,05$).

A cepa vínica 24, apesar de apresentar fenótipo sensível à toxina *killer* (K⁻R⁻) foi a cepa em que se observaram as maiores taxas de crescimento e produção de etanol (11,4% vol a 20 °C). Goddard (2008) analisou os fatores que determinam a prevalência da espécie *Saccharomyces cerevisiae* em processos de fermentação espontânea. Na publicação, o autor indica que o domínio de leveduras desta espécie não é devido apenas ao incremento na concentração de etanol. A fermentação de

uma solução equimolar de glucose e frutose (situação semelhante ao que se encontra na uva) é um processo que, além de etanol e gás carbônico, libera energia e, portanto, gera calor (em teoria, $104,43 \text{ kJ.mol}^{-1}$). O aumento de temperatura durante o processo, em conjunto com o baixo valor de pH e crescente concentração de etanol tende a desestabilizar a estrutura da parede celular de micro-organismos não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, possibilitando o domínio do processo por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A proposta do autor justifica a sobrevivência da cepa 24 nos processos de fermentação espontânea, típicos do município de Colombo, e, talvez, sua coexistência com a cepa 58 (K^+R^+) na cantina rural V.

Os resultados obtidos demonstram que, em relação à capacidade de produção de etanol a partir de sacarose, as cepas vínicas obtiveram desempenho semelhante ou superior à cepa comercial Uvaferm CK[®]. O resultado, obtido em condições laboratoriais, elimina, ou pelo menos diminui a probabilidade de uma destas cepas dominarem o processo e não serem capazes de conduzi-lo de forma adequada no que diz respeito à fermentação alcoólica sem ou com o processo de chaptalização.

5.2.2 Expressão da enzima β -glucosidase

A expressão da enzima β -glucosidase foi verificada para determinar se alguma das cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* teria a capacidade de hidrolisar terpenos ligados a dissacarídeos liberando suas formas voláteis e contribuindo, portanto, com o aroma do vinho (IRANZO; PÉREZ; CAÑAS, 1998; STRAUSS *et al.*, 2001).

O interesse na enzima β -glucosidase sintetizada por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ao invés daquela sintetizada pelo fungo filamentoso *A. niger*, utilizadas em preparações comerciais, ocorre pela diferença das propriedades físico-químicas entre elas. As últimas quando em condições de vinificação possuem cerca de metade da atividade (SPAGNA *et al.*, 2002; BARBAGALLO *et al.*, 2004) e,

por possuírem resquícios de outras enzimas, podem conferir aos vinhos algumas características indesejadas (VILLENNA; IRANZO; PÉREZ, 2007).

Fernández-González, Stefano e Briones (2003) e Fia, Giovanni e Rosi (2005) conduziram estudos em que foi detectada atividade β -glucosidásica na maioria das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* testadas quando utilizados substratos como o *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo (*p*-NPG) e 4-metil-umbeliferil- β -D-glucopiranosídeo (4-MUG). Entretanto, foi reportado que as moléculas *p*-NPG e 4-MUG são susceptíveis à ação de 1,3- β -glucanases, enzima expressa por quase todos os micro-organismos. Logo parte da atividade observada pode ter sido relativa a esta enzima (STRAUSS *et al.*, 2001; DAENEN *et al.*, 2007).

Para que se evitasse a ocorrência de falsos positivos, o presente estudo utilizou meio de cultivo contendo arbutin como substrato para ação enzimática, pois da mesma forma que a esculina, é considerado um substrato confiável para a detecção de atividade β -glucosidásica (STRAUSS *et al.*, 2001; PÉREZ, G. *et al.*, 2010). Quando hidrolisada, a molécula de arbutin libera uma molécula de hidroquinona que, na presença dos íons ferro, confere ao meio de cultivo a coloração marrom-escura. Como referência de *Saccharomyces cerevisiae* produtora de β -glucosidase, foi utilizada a cepa comercial Uvaferm CK[®] (Figura 14).

A análise da coloração dos meios de cultivo após 48 horas permitiu afirmar que em nenhuma das cepas vínicas testadas foi detectada atividade da enzima β -glucosidase. Ao contrário do que foi reportado por Daenen *et al.* (2007) a combinação entre arbutin e citrato férrico não inibiu o crescimento das cepas, como pode ser verificado pela turbidez do meio (Figura 14b).

Tal qual o presente estudo, Iranzo, Pérez e Cañas (1998), na tentativa de seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* para vinificação, não detectaram nenhuma cepa que expressasse β -glucosidase. Em outros casos, a baixa ocorrência é notada pela detecção de apenas uma cepa que apresenta atividade β -glucosidásica (ROSI; VINELLA; DOMIZIO, 1994; HERNANDEZ *et al.*, 2003; BARBAGALLO *et al.*, 2004; ORLIĆ *et al.*, 2010).

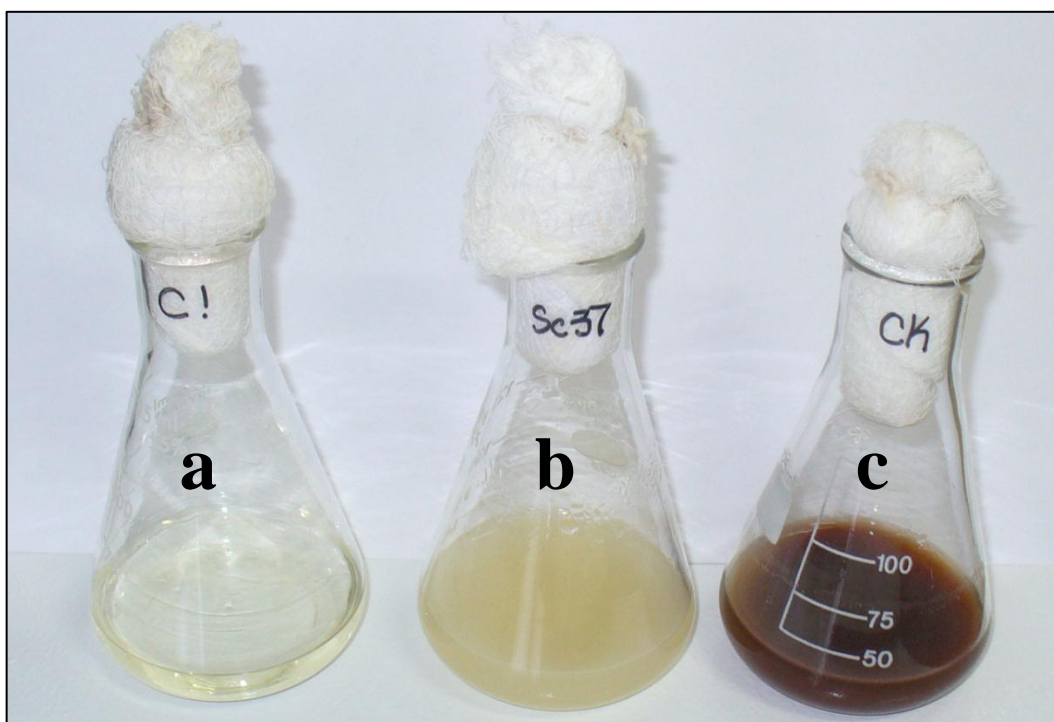


FIGURA 14 - SCREENING PARA A EXPRESSÃO DA ENZIMA β -GLUCOSIDASE EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO ARBUTIN E ÍONS FERRO

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As fotos indicam meio de cultivo sem inoculação (a) ou com a inoculação de levedura não produtora (b) e produtora (c) da enzima β -glucosidase.

A produção de β -glucosidase é variável entre espécies ou até mesmo entre cepas de mesma espécie. McMahon *et al.* (1999) conduziram um *screening* para a produção de β -glucosidase em 32 cepas de leveduras de diferentes espécies. Apesar de resultado positivo para algumas, apenas a levedura *Aureobasidium pullulans* foi capaz de hidrolisar os glucosídeos da uva no teste subsequente. Logo, a contribuição de cada micro-organismo para o desenvolvimento de aromas ainda não está completamente elucidada.

Apesar de haver estudos que indicam a contribuição da atividade β -glucosidásica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante a vinificação e que esta atividade não apresenta o revés de ser inibida por altas concentrações de glucose ou etanol, é consenso que estas cepas ocorrem com pouca frequência (PALMERI; SPAGNA, 2007; ORLIĆ *et al.*, 2010).

Pérez, G. *et al.* (2010) descrevem a detecção de atividade β -glucosidásica de leveduras autóctones de regiões vitivinícolas localizadas no Uruguai. Dentre as 154 leveduras analisadas, nove cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram capazes de sintetizar a enzima. As duas cepas selecionadas para fermentações de mosto de uva Muscat Miel demonstraram atividade β -glucosidásica significativamente superior às cepas comerciais utilizadas como controle.

Mesmo frente a dados que demonstram baixa ocorrência de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de sintetizar a enzima β -glucosidase, a identificação e seleção das mesmas ainda é considerada importante, uma vez que a espécie é sabidamente mais resistente ao etanol e domina o processo de vinificação logo nos primeiros dias, portanto, seria capaz de sintetizar a enzima até o final da fermentação alcoólica (RESTUCCIA *et al.*, 2002; BARBAGALLO *et al.*, 2004; CHASSAGNE *et al.*, 2005; PALMERI; SPAGNA, 2007; PÉREZ, G. *et al.*, 2010).

5.2.3 Expressão de poligalacturonase

Durante a etapa de esmagamento das uvas a pectina é liberada no mosto, formando coloides, dificultando a sedimentação de sólidos da fruta e, por consequência, conferindo turbidez e viscosidade ao mosto. Além das dificuldades

que isto acarreta ao processo, já foi demonstrada a associação entre vinhos elaborados com mostos ricos em sólidos suspensos e desvios sensoriais, como a produção exacerbada de álcoois superiores ou altas concentrações de compostos contendo enxofre (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

O fato de preparações comerciais de pectinases apresentarem atividade de outras enzimas, por vezes indesejáveis na elaboração de vinhos, e a descrição da expressão de poligalacturonase por leveduras do gênero *Saccharomyces* torna esta característica importante na seleção de cepas para a condução do processo (BLANCO; SIERO; VILLA, 1999; BELARBI *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2004).

No presente trabalho, seguiu-se a metodologia descrita por McKay (1988). O autor comenta que a solução de vermelho de rutênio penetra nas camadas do meio onde houve a degradação do ácido poligalacturônico, possibilitando a visualização de um halo vermelho/púrpura. Nos locais onde o ácido poligalacturônico permaneceu intacto, a solução de vermelho de rutênio permanece apenas na camada superficial, sendo facilmente removida com água (Figura 15).

Os resultados obtidos para as cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* indicam atividade pectinolítica em seis (43%), das 14 cepas analisadas, como mostra a Tabela 11.

Em relação à diversidade de cepas em função do local de isolamento, apenas as cantinas IV e VI não possuíram leveduras aptas a expressar poligalacturonase, com o contrário observado na cantina rural II. No restante das cantinas houve a coexistência de cepas produtoras e não produtoras da enzima. À exceção de Gainvors *et al.* (1994), que descrevem a detecção da atividade pectinolítica em apenas uma das 33 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* analisadas, a frequência de cepas com atividade pectinolítica detectadas neste estudo está condizente com o que traz a literatura.

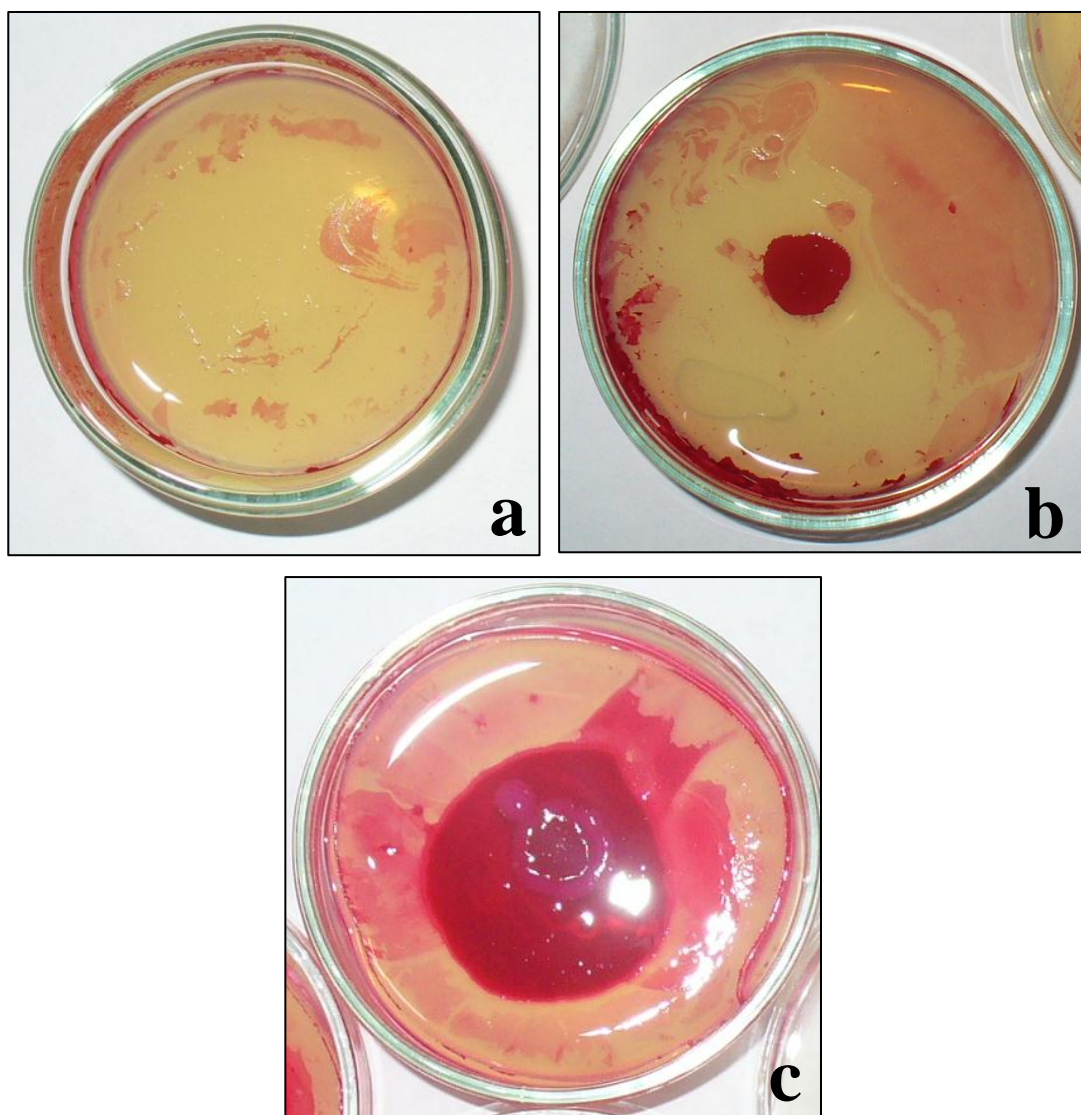


FIGURA 15 - SCREENING PARA A EXPRESSÃO DE POLIGALACTURONASE EM MEIO DE CULTIVO CONTENDO ÁCIDO POLIGALACTURÔNICO.

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As fotos indicam ensaio sem inoculação de levedura (a) ou com a inoculação de levedura não produtora (b) e produtora (c) de poligalacturonase.

TABELA 11 – RESULTADOS DO SCREENING PARA A EXPRESSÃO DE POLIGALACTURONASE

Cepas vínicas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Atividade pectinolítica (poligalacturonase)
24	+
27	-
29	-
33	+
34	+
37	+
47	-
48	+
49	-
50	+
51	-
53	-
58	-
59	-

Iranzo, Pérez e Cañas (1998), notam a atividade pectinolítica em 24 (33%) das cepas vínicas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Resultados ligeiramente maiores foram publicados por Fernández-González *et al.* (2004) e Orlić *et al.* (2005, 2010), que detectaram atividade pectinolítica em 60, 52 e 61% das cepas vínicas analisadas, respectivamente.

A capacidade das cepas vínicas estudadas em expressar enzimas pectinolíticas, em especial a poligalacturonase, é de grande interesse e possui potencial para utilização na elaboração de vinhos. Hou *et al.* (2008) citam a associação negativa entre a atividade desta enzima e a atividade das pectinesterases; conseqüentemente, há a associação negativa com a liberação de metanol na bebida.

Outro fator que contribui para a seleção de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* capazes da síntese de poligalacturonase é a presença de outras enzimas em preparações comerciais de enzimas pectinolíticas. Lao *et al.* (1997) reportam o diferenças significativas nas concentrações de metanol quando comparados vinhos elaborados com mostos com e sem suplementação utilizando preparações comerciais de enzimas pectinolíticas.

Vilanova *et al.* (2000) desenvolveram uma cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de sintetizar maiores quantidades de poligalacturonase em

condições de vinificação, pela superexpressão do gene *PGU1*, os autores relatam o aumento da taxa de filtração sem, no entanto, observar aumento da concentração de metanol. Quando da suplementação do mosto com a preparação comercial de enzimas pectinolíticas, os autores observaram o dobro da concentração de metanol dada a ação de pectinesterases presentes. Apesar de hoje ser possível de se encontrar algumas preparações enzimáticas com elevado grau de pureza, fatores como o preço e a própria prática de produtores de vinhos coloniais na utilização de quaisquer produtos exógenos em seus vinhos ainda podem ser impeditivos.

Além do aspecto de segurança, diretamente relacionado com a concentração de metanol que pode haver no produto final, há a questão que compreende a tecnologia do processo. A presença de enzimas pectinolíticas na vinificação é desejada por produtores de vinho, uma vez que aumentam as velocidades de clarificação e filtração do suco de uva e do vinho, além de melhorar aspectos relacionados à qualidade, e.g, pigmentação, transmitância e viscosidade (LAO *et al.*, 1997; IRANZO; PÉREZ; CAÑAS, 1998; CHEN, C.-H. *et al.*, 2009; VAN WYK; DIVOL, 2010).

5.3 SELEÇÃO DE CEPAS VÍNICAS

A compilação dos resultados das características enológicas verificadas em ambos os estudos é demonstrada pela Tabela 12. Se forem considerados os testes laboratoriais realizados, as cepas 24, 27, 33, 37, 48, 50 e 53 seriam de interesse para a realização de microvinificações para observar seu comportamento em mosto de vinificação e tentar prever sua real capacidade de conduzir um processo em maior escala.

TABELA 12 - COMPILAÇÃO DE PROPRIEDADES ENOLÓGICAS TESTADAS NAS CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* ISOLADAS DE COLOMBO, ESTADO DO PARANÁ

Cepas	Capacidade de crescimento ^a					Floculação ^a	Produção de H ₂ S ^a	Fenótipo <i>killer</i> ^b	Atividade enzimática ^b	
	Etanol (g.l ⁻¹)			Temperatura (°C)					β-glucosidase	Poligalacturonase
	100	130	150	37	45					
24	+++	++	+	+++	-	-	-	K ⁻ R ⁻	-	+
27	+++	+++	+++	+++	-	+	+	K ⁻ R ⁺	-	-
29	+++	++	+	+++	-	-	++	K ⁻ R ⁺	-	-
33	+++	-	-	+++	-	-	+	K ⁺ R ⁺	-	+
34	+++	+	-	+++	-	-	++	K ⁺ R ⁺	-	+
37	+++	-	-	+++	-	-	-	K ⁺ R ⁺	-	+
47	+++	-	-	+++	-	-	-	K ⁺ R ⁺	-	-
48	+++	-	-	+++	-	-	-	K ⁻ R ⁺	-	+
49	+++	+	-	+++	-	-	++	K ⁺ R ⁺	-	-
50	+++	-	-	+++	-	-	+	K ⁺ R ⁺	-	+
51	+++	-	-	+++	-	-	++	K ⁺ R ⁺	-	-
53	+++	++	-	+++	-	-	-	K ⁺ R ⁺	-	-
58	+++	-	-	+++	-	-	-	K ⁺ R ⁺	-	-
59	+++	+	-	++	-	-	-	K ⁺ R ⁺	-	-

^a características enológicas testadas por Guimarães (2005). intenso (+++); moderado (++); fraco (+); ausente (-)

^b características enológicas testadas por este trabalho. presente (+); ausente (-).

6 CONCLUSÕES

As reações de PCR-RFLP com as enzimas de restrição *TaqI* e *Tru1I* foram capazes de diferenciar as 14 cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* de acordo com quatro e três padrões de restrição, respectivamente. Cinco agrupamentos foram observados no caso da análise simultânea dos perfis eletroforéticos;

As cepas vínicas analisadas apresentaram maior frequência de fenótipo *killer* (71,4%), seguido dos fenótipos neutro (21,4%) e sensível (7,1%). Todas as cantinas rurais de onde foram isolados os micro-organismos apresentaram cepas vínicas com fenótipo *killer*. A coexistência de cepas de fenótipos sensível (24) e *killer* (59) foi observada na cantina rural V.

Em relação à síntese de hidrolases, nenhuma cepa vínica foi capaz de demonstrar atividade β -glucosidásica em meio de cultivo contendo arbutin e íons ferro. No entanto, atividade pectinolítica foi detectada em 43% das cepas analisadas, as quais hidrolisaram o ácido poligalacturônico, indicando a expressão de poligalacturonase.

Os resultados obtidos neste estudo, somados aos resultados obtidos por Guimarães (2005), servem de base para a seleção de cepas vínicas com potencial de condução de uma vinificação e o retorno de culturas puras destas cepas à comunidade produtora de Colombo, estado do Paraná. Uma vez que são isoladas de cantinas rurais do próprio município, a utilização de culturas puras destas cepas poderia atribuir características únicas ao produto e contribuindo, assim, para um eventual pedido de Indicação Geográfica para os vinhos da região.

REFERÊNCIAS

AA, E. *et al.* Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**. v.6, n.5, p. 702-715. 2006.

ABE, L. T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n. 2, p. 394-400. 2007.

ADDOR, F.; THUMM, N.; GRAZIOLI, A. Geographical Indications: Important issues for industrialized and developing countries. **The IPTS Report**. n. 74, p. 24-31. 2003.

AGNOLUCCI, M. *et al.* Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces* spp. strains associated to natural fermentation of 'Malvasia delle Lipari'. **Letters in Applied Microbiology**. v. 45, p. 657-662. 2007.

ANCÍN-AZPILICUETA, C.; GONZÁLEZ-MARCO, A.; JIMÉNEZ-MORENO, N. Comparative study of the amine concentration in wines obtained from the traditional fermentation and from a more anaerobic fermentation method. **LWT - Food Science and Technology**. v.43, n.5, p. 771-776. 2010.

AUSUBEL, F. M. *et al.* **Short protocols in molecular biology**. 4^a Ed. Nova Iorque: Wiley, 1999.

BADOTTI, F. *et al.* Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**. v.26, p. 579-587. 2009.

BALEIRAS-COUTO, M. M. *et al.* Evaluation of molecular typing to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 1, p. 41-46. 1996.

BARBAGALLO, R. N. *et al.* Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 35, p. 58-66. 2004.

BARNABÉ, D.; FILHO, W. G. V.; BOLINI, H. M. A. Quantitative descriptive analysis of wines produced from Niágara rosada and Bordô grapes. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 10, n. 2, p. 122-129. 2007.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. 3ª Ed. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2000.

BARRAJÓN, N. *et al.* Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. **Food Control**. v. 20, p. 778-783. 2009.

BAUER, R.; DICKS, L. M. T. Control of malolactic fermentation in wine. A review. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 25, n. 2, p. 74-88. 2004.

BEH, A. L. *et al.* Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages. In: HOCKING, A. D.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A.; THRANE, U. **Advances in food mycology**. Nova Iorque: Springer Science+Business Media, 2006

BELARBI, A. *et al.* Study of some physico-chemical characteristics of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase: a possible use in beverage industry. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 296-300. 2000.

BLANCO, P. *et al.* Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 13, p. 711-712. 1997.

BLANCO, P.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**. v. 175, p. 1-9. 1999.

BORDIGNON-LUIZ, M. T. *et al.* Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. **Food Science and Technology**. v. 40, p. 594-599. 2007.

BORNEMAN, A. R. *et al.* Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **FEMS Yeast Research**. v. 8, p. 1185-1195. 2008.

BOWEN, S.; ZAPATA, A. V. Geographical indications, *terroir*, and socioeconomic and ecological sustainability: The case of tequila. **Journal of Rural Studies**. v. 25, p. 108-119. 2009.

BRASIL. Portaria nº 76, de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1986.

BRASIL. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 1996. p. 8353.

BRASIL. Lei nº 10.970, de 12 de novembro de 2004. Altera dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 2004.

BREINIG, F. *et al.* Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.103, n.10, p. 3810-3815. 2006.

BRESCIA, M. A. *et al.* Characterization of geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometrics determinations. **Analytica Chimica Acta**. v. 458, p. 177-186. 2002.

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 22, p. 525-564. 1991.

BRUWER, J. South African wine routes: some perspectives on the wine tourism industry's structural dimensions and wine tourism product. **Tourism Management**. v. 24, p. 423-435. 2003.

CALLEJON, R. M. *et al.* Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Analytica Chimica Acta**. v.660, n.1-2, p. 68-75. 2010.

CAPECE, A. *et al.* Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 44, n. 1, p. 187-192. 2010.

CARRETO, L. *et al.* Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. **BMC Genomics**. v. 9, n. 1, p. 524-540. 2008.

CHASSAGNE, D. *et al.* Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. **Food Chemistry**. v. 91, n.1, p. 39-44. 2005.

CHAVAN, P. *et al.* Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**. v.26, n.801-808, p. 2009.

CHEN, C.-H. *et al.* Effect of phenolic acid and antioxidant activity of wine and inhibition of pectin methyl esterase. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 115, n. 4, p. 328-333. 2009.

CHEN, Y.-C. *et al.* Polymorphic Internal Transcribed Region 1 DNA Spacer sequences identify medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 11, p. 4042-4051. 2001.

CHOCIAI, M. B. *et al.* **Elaboração de vinhos**. Curitiba: Imprensa Universitária, 2000.

CIARDO, D. E. *et al.* Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 1, p. 77-84 2006.

CLAVIJO, A.; CALDERÓN, I. L.; PANEQUE, P. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. **International Journal of Food Microbiology**. v.143, n.3, p. 241-245. 2010.

CLEMENTE-JIMENEZ, J. M. *et al.* Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**. v. 21, p. 149-155. 2004.

COMBINA, M. *et al.* Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 1055-1061. 2005.

COZZOLINO, D. *et al.* Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand? **Food Chemistry**. v. 126, p. 673-678. 2011.

CSOMA, H. *et al.* Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. **International Journal of Food Microbiology**. v.140, n.2-3, p. 239-248. 2010.

DABHOLE, M. P.; JOISHY, K. N. Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on sensitive yeasts and fungal pathogens. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 4, p. 290-292. 2005.

DAENEN, L. *et al.* Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, p. 478-488. 2007.

DANI, C. *et al.* Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. **Toxicology in Vitro**. v. 24, p. 148-153. 2010.

DIAS, L. *et al.* Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiology**. v. 20, p. 567-574. 2003.

DORNELES, D. **Influência do emprego de variedades de *Saccharomyces cerevisiae* na elaboração do vinho tinto de uva terci oriunda do município de Colombo - PR.** Curitiba, 2003. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

EGLI, C. M. *et al.* Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. **Journal of Applied Microbiology**. v. 85, p. 779-789. 1998.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Uvas Rústicas para Processamento em Regiões Tropicais do Brasil.** Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/cultivares.htm>>. Acesso em: jan 2011.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 329-337. 1999.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T.; QUEROL, A. Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 85, p. 151-158. 2004.

ESTEVE-ZARZOSO, B. *et al.* Selection and molecular chracterization of wine yeast isolated from the 'El Penedès' area (Spain). **Food Microbiology**. v. 17, p. 553-562. 2000.

FALQUÉ, E.; FERNÁNDEZ, E.; DUBOURDIEU, D. Differentiation of white wines by their aromatic index. **Talanta**. v. 54, p. 271-281. 2001.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. *et al.* RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 78, p. 87-97. 2000.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M. T. *et al.* Molecular methods for identify and characterize yeasts in foods and beverages. In: QUEROL, A.; FLEET, G. **Yeasts in Foods and Beverages**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.55-82.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; STEFANO, R. D.; BRIONES, A. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. **Food Microbiology**. v. 20, p. 35-41. 2003.

FERNANDEZ-GONZALEZ, M. *et al.* Engineering of an oenological strain with pectinolytic activity and its effect on wine. **International Journal of Food Microbiology**. v.102, n.2, p. 173-183. 2005.

FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. *et al.* Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **FEMS Microbiology Letters**. v. 237, p. 261-266. 2004.

FERNÁNDEZ, M. T.; UBEDA, J. F.; BRIONES, A. I. Comparative study of non-Saccharomyces microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. **FEMS Microbiology Letters**. v. 173, p. 223-229. 1999.

FIA, G.; GIOVANI, G.; ROSI, I. Study of b-glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. **Journal of Applied Microbiology**. v.99, n.3, p. 509-517. 2005.

FLEET, G. H. Yeast interaction and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, p. 11-22. 2003.

FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 18, p. 170-175. 2007.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**. v. 8, n. 7, p. 979-995. 2008.

FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Computational approaches for the genetic and phenotypic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast collection. **Yeast**. v. 26, p. 675-692. 2009.

GAINVORS, A. *et al.* Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**. v. 10, p. 1311-1319. 1994.

GAMBELLI, L.; SANTARONI, G. P. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 17, p. 613-618. 2004.

GIL, J. *et al.* Over-production of the major exoglucanase of leads to an increase in the aroma of wine. **International Journal of Food Microbiology**. v.103, n.1, p. 57-68. 2005.

GODDARD, M. R. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. **Ecology**. v. 89, n. 8, p. 2077-2082. 2008.

GONZÁLEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). **Journal of Applied Microbiology**. v. 102, p. 1018-1025. 2006.

GRAINGER, K.; TATTERSALL, H. **Wine production: vine to bottle**. Oxford: Blackwell Publisher, 2005.

GRANCHI, L. *et al.* Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**. v. 87, p. 949-956. 1999.

GUILLAMÓN, J. M. *et al.* Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Arch Microbiol**. v. 169, p. 387-392. 1998.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. Curitiba, 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Univesidade Federal do Paraná.

GUIMARÃES, T. M. *et al.* Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, p. 119-126. 2006.

GULBINIENE, G. *et al.* Occurrence of killer yeast strains in fruit and berry wine yeast populations. **Food Technology and Biotechnology**. v. 42, n. 3, p. 159-163. 2004.

HAUSER, N. C. *et al.* Whole genome analysis of wine yeast strain. **Comparative and functional genomics**. v. 2, p. 69-79. 2001.

HERAS-VAZQUEZ, F. J. L. *et al.* Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. **FEMS Yeast Research**. v. 3, p. 3-9. 2003.

HERNANDEZ, L. *et al.* β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. **International Journal of Food Microbiology**. v. 80, n. 2, p. 171-176. 2003.

HOU, C. Y. *et al.* Effect of storage conditions on methanol content of fruit and vegetable juices. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 21, p. 410-415. 2008.

INFANTE, J. J. *et al.* Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptative evolution of natural yeast. **Genetics**. v. 165, n. 4, p. 1745-1759. 2003.

INPI. **Indicação Geográfica**. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-esquerdo/indicacao>>. Acesso em: jan 2011.

IRANZO, J. U.; PÉREZ, A. I. B.; CAÑAS, P. M. I. Study of the oenological characteristics and enzymatic activities of wine yeasts. **Food Microbiology**. v.15, p. 399-406. 1998.

JACKSON, R. S. **Wine Science**. 3ª Ed. San Diego: Elsevier, 2008.

JAMES, S. A. *et al.* Repetitive sequence variation and dynamics in the ribosomal DNA array of *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by whole-genome resequencing. **Genome Research**. v. 19, p. 626-635. 2009.

JAYANI, R.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process biochemistry**. v. 40, p. 2931-2944. 2005.

KAKUTA, S. M. *et al.* **Indicações geográficas: guia de respostas**. Porto Alegre: SEBRAE/RS, 2006.

KAPSOPOULOU, K. *et al.* Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.24, n.9, p. 1967-1971. 2008.

KASHYAP, D. R. *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**. v. 77, p. 215-227. 2001.

KUMAR, M.; SHUKLA, P. K. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. **J Clin Microbiol**. v. 43, n. 2, p. 662-8. 2005.

LALLEMAND. **Levaduras. Un mundo de soluciones naturales para añadir valor a tus vinos.** Disponível em: <http://www.lallemmandwine.us/products/yeast_chart.php>. Acesso em: Mai 2010.

LAO, C. *et al.* Pectic enzyme treatment effects on quality of white grape musts and wines. **Journal of Food Science**. v. 62, n. 6, p. 1142-1149. 1997.

LITI, G. *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. **Nature**. v. 458, p. 337-341. 2009.

LOPES, C. A. *et al.* Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.89, n.1, p. 147-156. 2006.

LOPES, C. A. *et al.* Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 34, p. 139-149. 2007.

LOUREIRO, M. L. Rethinking new wines: implications of local and environmentally friendly labels. **Food Policy**. v. 28, p. 547-560. 2003.

LOURENS, K.; PELLERIN, P. **Enzymes in winemaking**. Disponível em: <http://anchorwineyeast.com/en_winemaking_articles.html>. Acesso em: jan 2011.

LUYKX, D. M. A. M.; RUTH, S. M. V. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. **Food Chemistry**. v. 107, p. 897-911. 2008.

MALHERBE, S.; BAUER, F. F.; TOIT, M. D. Understanding problem fermentations - A review. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 28, n. 2, p. 169-186. 2007.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; PEINADO, J. Biology of killer yeasts. **International Microbiology**. v.5, n.2, p. 65-71. 2002.

MARTIN, G. J. The chemistry of chaptalization. **Endeavour**. v. 14, n. 3, p. 137-143. 1990.

MARTÍNEZ, C. *et al.* High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p. 2185-2195. 2007.

MATEO, J. J.; JIMÉNEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**. v. 881, p. 557-567. 2000.

MATEO, J. J.; STEFANO, R. D. Description of the β -glucosidase activity in wine yeasts. **Food Microbiology**. v. 14, p. 583-591. 1997.

MCGOVERN, P. E.; MIRZOIAN, A.; HALL, G. R. Ancient Egyptian herbal wines. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.106, n. 18, p. 7361-7366. 2009.

MCKAY, A. M. A plate assay method for the detection of fungal polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**. v. 56, n. 3, p. 355-358. 1988.

MCMAHON, H. *et al.* Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 198-203. 1999.

MELLO, L. M. R. D. **Vitivinicultura brasileira: Panorama em 2009**. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/>>. Acesso em: Dez 2010.

MILLS, D. A. *et al.* Wine Fermentation. In: COCOLIN, L.; ERCOLINI, D. **Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods**. Nova Iorque: Springer, 2008. p.162-192.

MITTERDORFER, G. *et al.* Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. **Journal of Applied Microbiology**. v. 93, p. 521-530. 2002.

MONTROCHER, R. *et al.* Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, p. 295-303. 1998.

MORENO-ARRIBAS, V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. Nova Iorque: Springer, 2009.

MORRISEY, W. F. *et al.* The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. **Journal of Applied Microbiology**. v. 97, p. 647-655. 2004.

NAUMOVA, E. S. *et al.* Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. **FEMS Yeast Research**. v. 3, p. 177-184. 2003.

NIKOLAOU, E. *et al.* Heterogeneity in genetic and phenotypic characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from red and white wine fermentations. **Food Control**. v. 18, p. 1458-1465. 2007.

NIXDORF, S. L.; HERMOSÍN-GUTIERREZ, I. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. **Analytica Chimica Acta**. v. 659, p. 208-215. 2010.

ORDUÑA, R. M. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. **Food Research International**. v.43, n. 7, p. 1844-1855. 2010.

ORLIĆ, S. *et al.* Diversity and oenological characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* associated with Žilavka grapes. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 26, p. 1483-1489. 2010.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, n. 1, p. 34-50. 2000.

OVERTON, J. The consumption of space: Land, capital and the place in the New Zealand wine industry. **Geoforum**. v. 41, p. 752-762. 2010.

PALMERI, R.; SPAGNA, G. β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, n. 3, p. 382-389. 2007.

PARR, W. V. *et al.* The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon blanc: Sensory characterisation by wine professional. **Food Quality and Preference**. v. 18, p. 849-861. 2007.

PATHANIA, N. *et al.* Application of different molecular techniques for deciphering genetic diversity among yeast isolates of traditional fermented food products of Western Himalayas. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 26, n. 9, p. 1539-1547. 2010.

PÉREZ, F.; RAMÍREZ, M.; REGODÓN, J. A. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 79, p. 393-399. 2001.

PÉREZ, G. *et al.* A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. p. 2010.

PETERING, J. E. *et al.* Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using marked *Saccharomyces* wine yeast strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, n.11, p. 3232-3256. 1991.

PIŠKUR, J.; LANGKJÆR, R. B. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. **Molecular Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 381-389. 2004.

POSTERARO, B. *et al.* Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 103, p. 295-304. 2005.

PRETORIUS, I. S.; HØJ, P. B. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. v. 11, p. 83-108. 2005.

RADOI, F.; KISHIDA, M.; KAWASAKI, H. Characteristics of wines made by *Saccharomyces* mutants which produce a polygalacturonase under wine making conditions. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v. 69, p. 2224-2226. 2005a.

RADOI, F.; KISHIDA, M.; KAWASAKI, H. Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. **FEMS Yeast Research**. v. 5, p. 663-668. 2005b.

RAINIERI, S.; PRETORIUS, I. S. Selection and improvement of wine yeasts. **Annals of Microbiology**. v.50, p. 15-31. 2000.

RASPOR, P. *et al.* Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of Dolenjska vine-growing region, Slovenia. **International Journal of Food Microbiology**. v. 109, p. 97-102. 2006.

RASPOR, P.; ZUPAN, J.; ČADEŽ, N. Validation of yeast identification by *in silico* RFLP. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**. v. 15, p. 267-281. 2007.

RESTUCCIA, C. *et al.* A β -glucosidase positive strain of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must. **Annals of Microbiology**. v. 52, p. 47-53. 2002.

REVILLA, I.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. **Food Chemistry**. v. 63, n. 3, p. 307-312. 1998.

REVILLA, I.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 38, p. 29-36. 2003.

RIBÉREAU-GAYON, P. *et al.* **Handbook of Enology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2006.

RIZZON, L. A.; LINK, M. Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**. v. 36, n. 2, p. 689-692. 2006.

RODRIGUEZ-COUSIÑO, N. *et al.* A new wine *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus encoded killer toxin (*Klus*) with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 2011.

RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. **Journal of Applied Microbiology**. v. 108, p. 1292-1302. 2010.

RODRÍGUEZ, M. E. *et al.* Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glucosidase activities. **Journal of Applied Microbiology**. v. 96, p. 84-95. 2004.

ROMANO, P. *et al.* Biodiversity of wild strains of *Sacharomyces cerevisiae* as a tool to complement and optimize wine quality. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 24, p. 1797-1802. 2008.

ROMANO, P. *et al.* Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**. v. 86, p. 169-180. 2003.

ROMBALDI, C. V. *et al.* Produtividade e qualidade de uva, cv. Isabel, em dois sistemas de produção. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 1, p. 89-91. 2004.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of b-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 77, p. 519-527. 1994.

RUIZ, P. *et al.* Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. **International Journal of Food Microbiology**. v.137, n.2-3, p. 230-235. 2010.

SABATE, J. *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. **Microbiol. Res.** v. 157, p. 267-274. 2002.

SALINAS, F. *et al.* Taqman real-time PCR fot the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. **Food Microbiology**. v. 26, p. 328-332. 2009.

SALINAS, F. *et al.* Genomic and phenotypic comparison between similar wine yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* from different geographic origins. **Journal of Applied Microbiology**. v. 198, n. 5, p. 1850-1858. 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ª Ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGORRÍN, M. *et al.* Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. **International Journal of Food Microbiology**. v.119, n.3, p. 351-357. 2007.

SCHACHERER, J. *et al.* Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**. v.458, n.7236, p. 342-345. 2009.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, p. 257-276. 2002.

SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. **Nature Reviews Microbiology**. v.4, n.3, p. 212-221. 2006.

SCHULLER, D. *et al.* Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiology Letters**. v. 231, p. 19-26. 2004.

SIPICZKI, M. Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome—a review. **Annals of Microbiology**. p. 2010.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 11, p. 287-313. 1997.

SOUCIET, J. L. *et al.* Comparative genomics of protoploid *Saccharomycetaceae*. **Genome Research**. v. 19, p. 1967-1709. 2009.

SPAGNA, G. *et al.* Properties of endogenous β -glucosidase of *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from Sicilian musts and wines. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 1030-1035. 2002.

STRAUSS, M. L. A. *et al.* Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 182-190. 2001.

SWIEGERS, J. H. *et al.* Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. v. 11, p. 139-173. 2008.

TECCHIO, F. M.; MIELE, A.; RIZZON, L. A. Composição físico-química do vinho Bordô de Flores da Cunha, RS, elaborado com uvas maturadas em condições de baixa precipitação. **Ciência Rural**. v. 37, n. 5, p. 1480-1483. 2007.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics**. v. 22, n. 9, p. 511-519. 2006.

TORIJA, M. J. *et al.* Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 79, n. 3-4, p. 345-352. 2001.

TORRIANI, S. *et al.* Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. **Letters in Applied Microbiology**. v. 38, n. 3, p. 239-244. 2004.

ÚBEDA, J. F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; BRIONES, A. I. Application of PCR-TTGE and PCR-RFLP for intraspecific and interspecific characterization of the genus *Saccharomyces* using actin gene (*ACT1*) primers. **Curr Microbiol**. v. 58, p. 58-63. 2009.

UVIBRA. **Produção de uva, elaboração de vinhos e derivados**. Disponível em: <www.uvibra.com.br>. Acesso em: dez 2010.

VALENTE, P. *et al.* PCR amplification of the rDNA internal transcribed spacer region for differentiation of *Saccharomyces* cultures. **FEMS Microbiology Letters**. v. 137, p. 253-256. 1996.

VALERO, E. *et al.* Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. **FEMS Yeast Research**. v. 7, p. 317-329. 2007.

VAN WYK, H.; DIVOL, B. Recovery of endo-polygalacturonase activity in wine yeast and its effect on wine aroma. **FEMS Yeast Research**. v. 10, n. 1, p. 58-71. 2010.

VARELA, C. *et al.* Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with 'wild' indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. v.15, n.3, p. 238-248. 2009.

VENEMA, J.; TOLLERVEY, D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Genet.** v.33, p. 261-311. 1999.

VILANOVA, M. *et al.* Use of a *PGU1* recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. **Journal of Applied Microbiology**. v. 89, p. 876-883. 2000.

VILLENA, M. A.; IRANZO, J. U.; PÉREZ, A. I. B. β -glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 420-425. 2007.

VUUREN, H. J. J.; JACOBS, C. J. Killer yeasts in the wine industry: A review. **Am. J. Enol. Vitic.** v. 43, n. 2, p. 119-128. 1992.

VUUREN, H. J. J. V.; WINGFIELD, B. D. Killer yeasts - cause of stuck fermentation in wine cellars. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 7, n. 2, p. 113-118. 1986.

WIEL, A.; GOLDE, P. H. M.; HART, H. C. Blessings of the grape. **European Journal of Internal Medicine**. v. 12, p. 484-489. 2001.

WOODS, D. R.; BEVAN, E. A. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 51, p. 115-126. 1968.

XUFRE, A. *et al.* Use of RAPD analysis for differentiation among six enological *Saccharomyces* spp. strains. **Food Technology and Biotechnology**. v. 38, n. 1, p. 53-58. 2000.

YANG, J.; MARTINSON, T. E.; LIU, R. H. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. **Food Chemistry**. v. 116, p. 332-339. 2009.

ZOECKLEIN, B. W. *et al.* **Análisis y producción de vino**. Zaragoza: Editorial Acríbia S.A, 2001.